

# **Einflüsse auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung in methanogenen Systemen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Jörn Sebastian Penger**

aus Essen

Marburg/Lahn 2012

Die Untersuchungen zur folgenden Arbeit wurden von Januar 2009 bis Dezember 2011 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. Ralf Conrad durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am: 18. September 2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Conrad  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Rudolf K. Thauer

Tag der Disputation: 9. Oktober 2012

Die in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

**Penger, J. S., Conrad, R. und Blaser, M. B.** (2012) Stable carbon isotope fractionation by methylotrophic methanogenic archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(21): 7596-7602.

*Für meinen Vater*

*„Ein gutes Pferd springt nicht höher als es muss.“*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Vorbemerkungen und Abkürzungen .....</b>	<b>3</b>
1.1	Vorbemerkungen.....	3
1.2	Abkürzungen .....	3
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
3.1	Globale Erwärmung und Treibhausgase.....	6
3.2	Anaerober Abbau von organischem Material zu Methan .....	8
3.3	Grundlagen der stabilen Isotopenfraktionierung .....	10
3.4	Fraktionierungskoeffizienten und äußere Einflüsse.....	12
3.5	Ziele der Arbeit.....	14
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
4.1	Sterilisationsverfahren.....	15
4.2	Chemikalien und Gase.....	15
4.3	Mikroorganismen .....	15
4.4	Kultivierungsbedingungen .....	15
4.4.1	Kultivierung von <i>Methanothermobacter marburgensis</i> .....	15
4.4.2	Kultivierung von <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> .....	17
4.4.3	Kultivierung von <i>Methanosarcina acetivorans</i> .....	17
4.4.4	Kultivierung von <i>Methanosarcina barkeri</i> .....	18
4.4.5	Kultivierung von <i>Methanlobus zinderi</i> .....	19
4.4.6	Kultivierung von <i>Thermoanaerobacter kivui</i> .....	21
4.4.7	Temperaturkontrolle .....	23
4.5	Chemische Analysen .....	23
4.5.1	Quantitative chromatographische Analysen .....	23
4.5.2	Stabile Kohlenstoff-Isotopenverhältnismessung .....	24
4.5.3	Bestimmung des pH-Wertes .....	27
4.5.4	Berechnungen .....	27
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
5.1	Kohlenstoffisotopenfraktionierung verschiedener Stoffwechselwege .	29

5.1.1	Isotopenfraktionierung in hydrogenotrophen methanogenen Archaeen.....	29
5.1.2	Isotopenfraktionierung in methylotrophen methanogenen Archaeen .....	33
5.1.3	Isotopenfraktionierung in homoacetogenen Bakterien .....	37
5.2	Temperaturabhängigkeit der Kohlenstoffisotopenfraktionierung .....	40
5.2.1	Einfluss der Temperatur auf hydrogenotrophe methanogene Archaeen .....	40
5.2.2	Einfluss der Temperatur auf methylotrophe methanogene Archaeen.....	42
5.2.3	Einfluss der Temperatur auf homoacetogene Bakterien.....	47
5.3	pH-Abhängigkeit der Kohlenstoffisotopenfraktionierung.....	49
5.3.1	Änderung des pH-Wertes im hydrogenotrophen methanogenen System.....	49
5.4	Kohlenstoffisotopenfraktionierung unter Einsatz von Inhibitoren .....	52
5.4.1	Methylfluorid im methylotrophen methanogenen System.....	52
6	Diskussion.....	54
6.1	„Fraktionierungsfenster“ der verschiedenen Stoffwechselwege .....	54
6.2	„Natürliche“ Einflüsse auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung.....	59
6.3	Kohlenstoffisotopenfraktionierung beim Einsatz von Inhibitoren .....	63
6.4	Zusammenfassende Diskussion.....	65
7	Literatur .....	66
	Curriculum Vitae.....	71
	Danksagung .....	72
	Erklärung .....	73
	Zusammenstellung der Messwerte.....	74

# 1 Vorbemerkungen und Abkürzungen

## 1.1 Vorbemerkungen

Die Abbildungen, Tabellen und Schemata wurden innerhalb der Kapitel fortlaufend nummeriert. In Abbildungen und Tabellen angegebene  $\pm$ -Werte stellen bei Fraktionierungskoeffizienten immer den Standardfehler der linearen Regression über die Einzelwerte aller Replikate dar. In allen anderen Fällen (Stoffmengen, Ausbeute, Methanproduktionsraten) stellen diese den Standardfehler des Mittelwerts aus den Werten der einzelnen Replikate dar.

## 1.2 Abkürzungen

bidest.	bidestilliert
°C	Grad Celsius
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography
IRMS	Isotope ratio mass spectrometry
MeF	Methylfluorid
min	Minuten
NTA	Nitrilotriessigsäure
p.a.	per analysis
ppbv	parts per billion by volume
ppmv	parts per million by volume
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor

## 2 Zusammenfassung

In unserer Atmosphäre stellt Methan eines der klimarelevantesten Treibhausgase dar. Es entsteht als Endprodukt des Abbaus von organischem Material in vielen anoxischen Habitaten. Innerhalb von Reisfeldböden und Feuchtgebieten wird Methan größtenteils durch acetoklastische und hydrogenotrophe methanogene Archaeen gebildet. Einige dieser Methanogenen können allerdings auch C<sub>1</sub>-Verbindungen wie Methanol als Substrat nutzen. Über die an der Methanproduktion beteiligten Stoffwechselwege kann die Kohlenstoffisotopensignatur der Substrate und des freigesetzten Methans Aufschluss geben. Für eine Quantifizierung müssen allerdings die Fraktionierungskoeffizienten der beteiligten mikrobiellen Gruppen bekannt sein. In der Vergangenheit wurden die meisten Daten für hydrogenotrophe und acetoklastische Reinkulturen erhoben. Der Informationsstand bezüglich der Methanogenese auf Methanol war hingegen sehr gering. Da Bodenproben meist in geschlossenen Systemen inkubiert werden, sollte zusätzlich überprüft werden, ob sich die zuvor für hydrogenotrophe und methylotherme Reinkulturen innerhalb offener Systeme erhaltenen Daten auf geschlossene Systeme übertragen lassen.

Bei der Umwandlung von Methanol zu Methan konnten in *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri* und *Methanobrevibacter smithii* ähnlich starke Fraktionierungskoeffizienten (-83‰ bis -72‰) beobachtet werden wie sie zuvor für das offene System (-83‰ bis -79‰) beschrieben wurden. Für die untersuchten hydrogenotrophen Methanogenen, *Methanothermobacter marburgensis* und *Methanothermobacter thermophilus*, konnte bei der Umsetzung von H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> zu Methan sowohl in carbonathaltigem als auch in carbonatfreien Medium ebenfalls eine Übereinstimmung der Fraktionierungskoeffizienten (-38‰ bis -31‰) mit den bisher nur in offenen Systemen (-60‰ bis -28‰) beschriebenen Daten erhalten werden. Für den ebenfalls H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> als Substrat verwendenden Homoacetogenen *Thermoanaerobacter kivui* wurden im geschlossenen System etwas niedrigere Fraktionierungskoeffizienten (-44‰ bis -41‰) festgestellt als für die hier untersuchten, hydrogenotrophen Methanogenen.

Eine Veränderung der Inkubationstemperatur zeigte bei den fünf untersuchten Methanogenen sowie bei dem untersuchten homoacetogenen Mikroorganismus auch in unterschiedlichen Puffersystemen keinen Einfluss auf die Kohlenstoffisotopensignatur. In Folge dessen konnte auch keine Abhängigkeit des Fraktionierungskoeffizienten zur Inkubationstemperatur beobachtet werden.

Weiterhin konnte bei der hydrogenotrophen Methanogenese in *M. marburgensis* eine große Stabilität des Fraktionierungskoeffizienten gegenüber dem pH-Wert des Mediums festgestellt werden. Somit können bei einer Quantifizierung der an der Methanproduktion beteiligten Stoffwechselwege in Bodenproben diese Faktoren weitestgehend vernachlässigt werden.

Durch die Verwendung selektiver Inhibitoren können zusätzliche Informationen zur Quantifizierung der an der Methanproduktion beteiligten Stoffwechselwege erhalten werden. Es wurde bisher angenommen, dass durch die Zugabe von Methylfluorid als Inhibitor der



acetoklastischen Methanogenese lediglich die Kohlenstoffisotopensignatur des durch hydrogenotrophe Methanogenese erzeugten Methans erhalten wird. Da aber die Zugabe von Methylfluorid den Fraktionierungskoeffizienten der methylotropen Methanogenese nicht beeinflusste, kann in Gegenwart von Methylfluorid produziertes „leichtes“ Methan aufgrund der starken Fraktionierung auch durch methylotrophe und nicht nur durch hydrogenotrophe Methanogenese erzeugt werden.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Globale Erwärmung und Treibhausgase

Die Jahresdurchschnittstemperatur ist in den letzten 100 Jahren um fast 1°C gestiegen, davon allein um mehr als 0,7°C in den letzten 35 Jahren (Abb. 3.1). Da die Ozeane seit 1961 fast 80% der dem Klimasystem zugeführten Wärme aufgenommen haben, haben sich diese ausgedehnt, was zu einem Ansteigen des Meeresspiegels geführt hat. Das durch die Erwärmung induzierte Abschmelzen der Polkappen und Gebirgsgletscher verstärkt diesen Effekt noch zusätzlich. Als weitere Folgen des Klimawandels treten geänderte Niederschlagsmengen, Änderungen im Salzgehalt der Ozeane, in Windmustern und bei extremen Wetterereignissen wie Trockenheit, Starkniederschlägen, Hitzewellen sowie in der Intensität von tropischen Wirbelstürmen auf (IPCC, 2007).

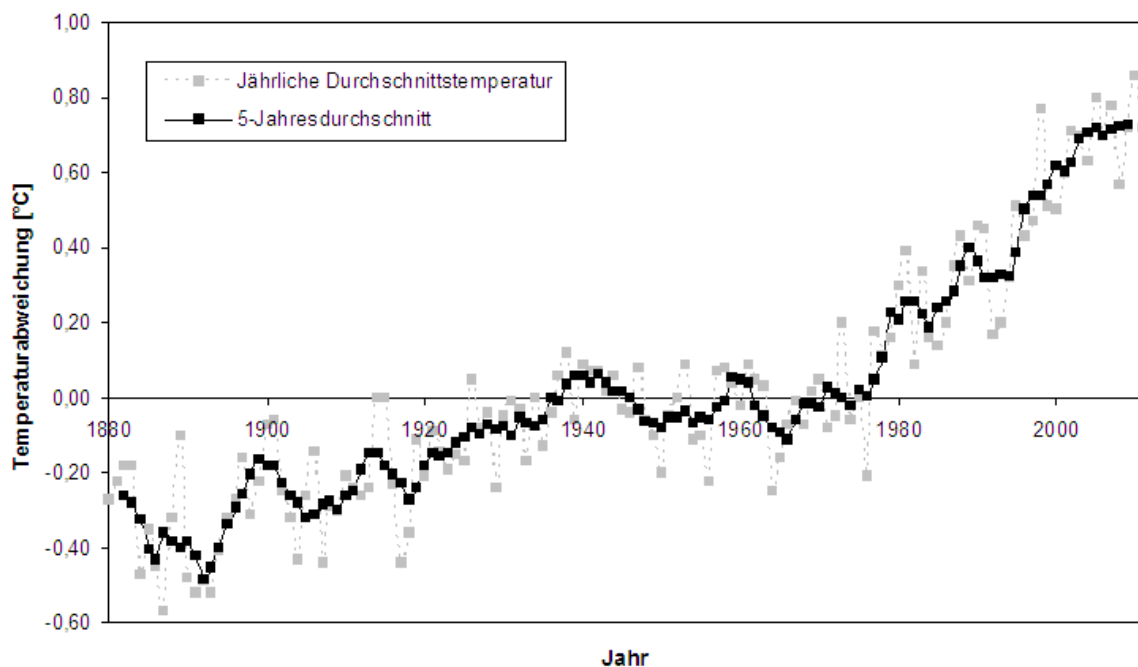


Abbildung 3.1: Änderungen der jährlichen Durchschnitts- und 5-Jahresdurchschnittstemperaturen von 1880 bis 2011 bezogen auf den Durchschnitt der Jahre 1951 bis 1980 (GISS, 2012; Hansen *et al.*, 2001).

Diese Auswirkungen auf das globale Klimasystem durch steigende Temperaturen lassen sich teilweise direkt auf die steigende Konzentration an Treibhausgasen in der Atmosphäre zurückführen (Oreskes, 2005). Zu den bedeutendsten gehören hierbei aufgrund ihrer Emissionsrate und ihres Treibhauspotentials Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ), Methan ( $\text{CH}_4$ ) und Lachgas ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Der Ausstoß dieser Gase ist seit Beginn der industriellen Revolution in der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts stark angestiegen. Den prozentual stärksten Anstieg verzeichnete hierbei das emittierte Methan dessen Konzentration in der Atmosphäre von 715 ppbv um fast 150% auf 1774 ppbv gestiegen ist (IPCC, 2007). Wie Messungen in

Eisbohrkernen ergaben ist dies die höchste Konzentration seit mindestens 800.000 Jahren, in denen die atmosphärische Methankonzentration zwischen etwa 350 ppbv und 800 ppbv differierte (Louergue *et al.*, 2008). Da das Treibhauspotential von Methan über 100 Jahre betrachtet das 25-fache von Kohlenstoffdioxid erreicht, ist es wichtig die an Entstehung und Verbrauch beteiligten Prozesse zu identifizieren (Shindell *et al.*, 2009).

Hierfür wird zwischen natürlichen und anthropogenen Quellen unterschieden. Als natürliche Quellen sind durch Methanogenese in natürlichen Feuchtgebieten entstehendes Methan, aus Methanhydraten emittiertes Methan und durch Termiten bei der Verdauung enzymatisch gebildetes Methan zu nennen. Die anthropogenen Quellen, welche für 60% der gesamten Methanemissionen verantwortlich sind, können in mehrere große Bereiche eingeteilt werden. Die wichtigsten stellen hierbei Landwirtschaft mit Rinderzucht und Nassreisanaubau, Energiegewinnung und Abfallentsorgung dar (Karakurt *et al.*, 2012).

Seit März 2002 werden zu dem Zweck der besseren Identifizierung der Quellen mithilfe des SCIAMACHY (Scanning Imaging Absorption Spectrometer for Atmospheric CHartography) an Bord des Umweltsatelliten ENVISAT (ENVironmental SATellite) globale Karten der Konzentrationen von atmosphärischen Spurengasen erstellt (Abb. 3.2). Die höchsten gemessenen Konzentrationen korrelieren hier weitgehend mit Reisanbaugebieten und natürlichen Feuchtgebieten (Frankenberg *et al.*, 2005).

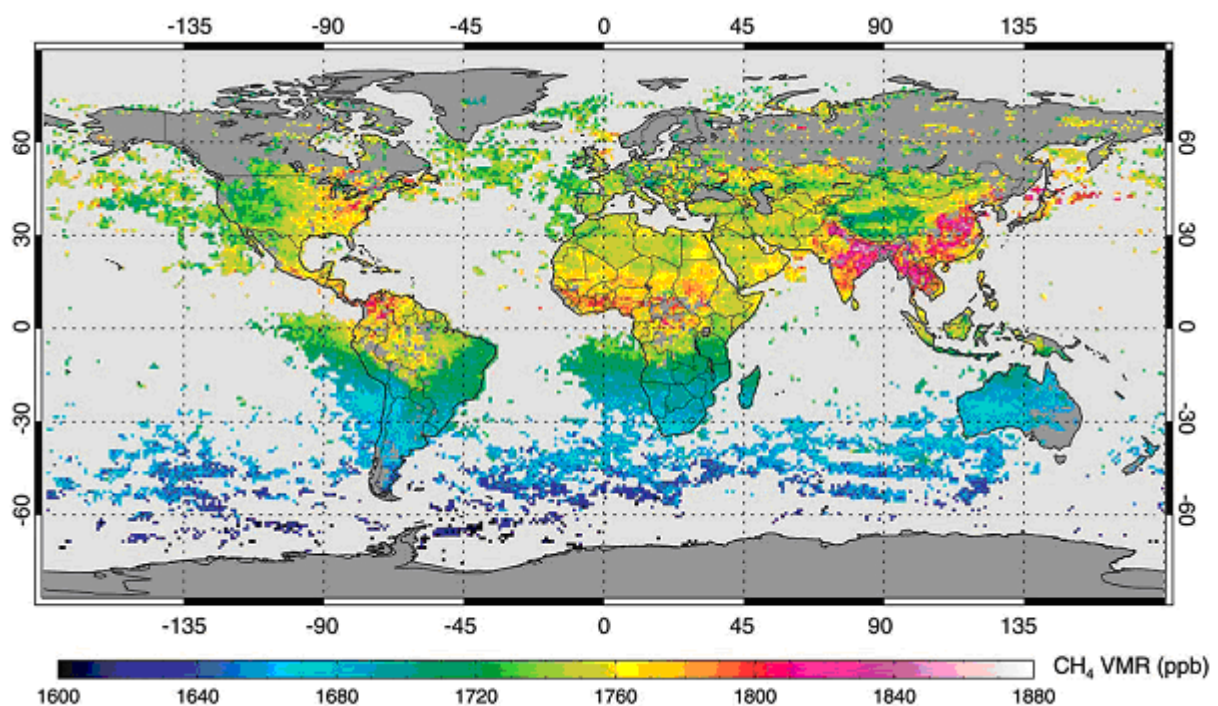


Abbildung 3.2: SCIAMACHY-Messungen (August bis November 2003) der Methan-Volumenmischungsverhältnisse. Für jede Zelle des 1°-Rasters wurden mindestens 5 (bis zu 150) Messungen gemittelt. Werte mit einer Standardabweichung von über 0,5% wurden verworfen (Frankenberg *et al.*, 2005).

### 3.2 Anaerober Abbau von organischem Material zu Methan

Das von diesen gefluteten Reisfeldern und natürlichen Feuchtgebieten emittierte Methan entsteht durch den anaeroben Abbau von Biomasse. Im Gegensatz zu anderen oxidativen Prozessen ist an diesem nicht nur ein einziger Organismus beteiligt, sondern es sind mindestens vier verschiedene funktionelle Gruppen involviert (Schink, 1997). Dazu zählen Primärfermentierer, Sekundärfermentierer sowie hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogene (Abb. 3.3). Ausgehend vom Polymer (Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren und Lipide) stellt jeder darauf folgende Schritt wiederum das Substrat für die nachfolgende Reaktion zur Verfügung.

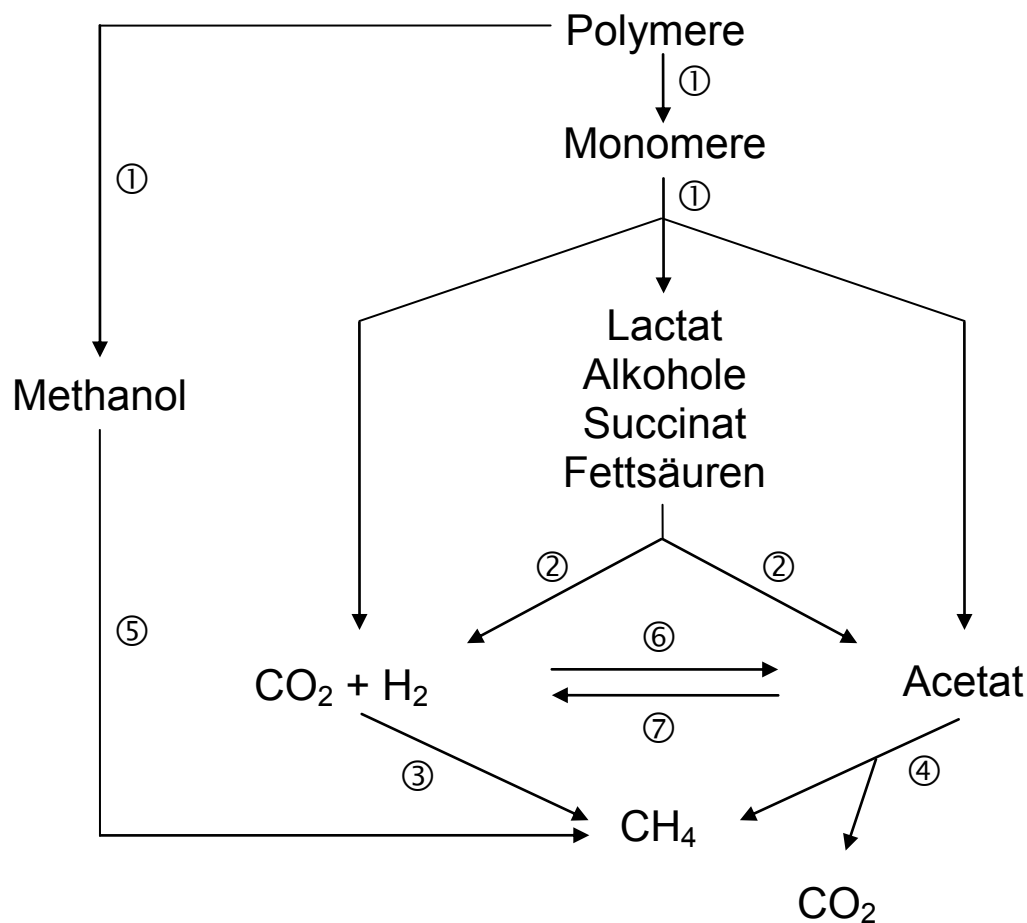
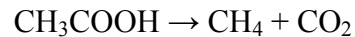
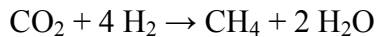


Abbildung 3.3: Stoffwechselwege des anaeroben Abbaus von organischem Material durch verschiedene Mikroorganismengruppen. ① Primärfermentierer; ② Sekundärfermentierer; ③ hydrogenotrophe, ④ acetoklastische und ⑤ methylotrophe methanogene *Archaeen*; ⑥ homoacetogene Bakterien; ⑦ syntroph acetatoxidierende Bakterien.

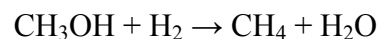
Zu Beginn werden Polymere von Primärfermentierern zu Oligomeren und Monomeren (Zucker, Aminosäuren, Purine, Pyrimidine, Fettsäuren und Glycerin) hydrolysiert. Die entstandenen Monomere werden von der gleichen bakteriellen Gruppe zu kürzeren Fettsäuren, Succinat, Alkoholen und Lactat fermentiert. Manche dieser entstandenen Fermentationsprodukte, insbesondere Acetat, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und entstandene C<sub>1</sub>-Substanzen können

direkt von methanogenen Archaeen zu Methan und CO<sub>2</sub> umgesetzt werden. Aus den übrigen Intermediaten werden wiederum von Sekundärfermentierern Vorläuferverbindungen für die Methanogenese produziert.



*Schema 3.1:* Bilanzgleichungen der hydrogenotrophen und acetoklastischen Methanogenese.

Die wichtigste C<sub>1</sub>-Substanz, welche im Boden als Endprodukt des Pektin-Metabolismus entsteht, ist Methanol (Conrad und Claus, 2005). Bei Pektin, welches einen wichtigen Baustein von Pflanzenzellen darstellt, handelt es sich um ein Polyuronid aus Galacturonsäuren, welche α-1,4-, teils auch zu einem geringen Anteil über β-1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (Schink und Zeikus, 1982). Je nach Herkunft sind neben anderen Veränderungen die Carboxygruppen unterschiedlich oft mit Methanol verestert. Während des anaeroben mikrobiellen Abbaus kommt es hier zu einer Hydrolyse der Esterbindung und der Freisetzung des Methanols in den Boden (Schink und Zeikus, 1980). Methylo trope methanogene Archaeen können aus dieser C<sub>1</sub>-Substanz wiederum Methan produzieren (Abb. 3.3). Je nach Organismus kann dies entweder unter Produktion von CO<sub>2</sub> oder unter Konsumtion von Wasserstoff geschehen (Thauer, 1998).



*Schema 3.2:* Bilanzgleichungen der auf Methanol beruhenden Stoffwechselwege.

Studien zeigen allerdings, dass wahrscheinlich weniger als 5-10% des durch Methanogenese entstehenden Methans methylo trophe aus Methanol gebildet wird (Jiang *et al.*, 2010; King *et al.*, 1983; Lovley und Klug, 1983; Nusslein und Conrad, 2000).

Da gleich bleibende bzw. weiter steigende Emissionen von Treibhausgasen in der Zukunft noch stärkere Änderungen im globalen Klimasystem bewirken würden, ist es wichtig die Entstehung der verschiedenen Gase genau zu verstehen. Für Methan bedeutet dies auch Stoffwechselwege über welche Methan produziert wird unterscheiden zu können. Da aber viele Intermediate in mehreren Abbauwegen auftauchen, ist eine Charakterisierung der beteiligten Mikroorganismen über eine Bestimmung der Stoffmengen alleine nicht möglich. Für eine Unterscheidung in Umweltstudien wird weithin Methylfluorid als ein selektiver Hemmstoff der acetoklastische Methanogenese verwendet (Conrad und Klose, 1999; Janssen und Frenzel, 1997; Liu *et al.*, 2011). Allerdings ist derzeit unklar wie methylo trope Methanogene auf die Hemmung durch Methylfluorid reagieren.

Möglicherweise hat diese Hemmung auch einen Einfluss auf eine andere gebräuchliche Methode zur Unterscheidung der Quellen des Methans. Für diese macht man sich die

natürliche Fraktionierung der stabilen Kohlenstoffisotope in den zu untersuchenden Bodenproben zu Nutze.

### 3.3 Grundlagen der stabilen Isotopenfraktionierung

Neben dem für die Unterscheidung der Quellen des Methans wichtigen Kohlenstoff weisen die meisten anderen Elemente ebenfalls Isotope auf. Lediglich 22 Elemente sind so genannte Reinelemente von denen nur ein natürliches Isotop existiert. Alle anderen weisen mehrere, im Fall von Zinn sogar zehn, verschiedene Isotope auf. Die Verschiebung der Häufigkeiten von Isotopen in diesen Mischelementen während eines physikalischen, chemischen oder biologischen Prozesses wird Isotopenfraktionierung genannt.

Im Falle des Kohlenstoffs existieren neben dem radioaktiven  $^{14}\text{C}$  zwei stabile Isotope. Das Isotop  $^{13}\text{C}$  hat einen natürlichen Anteil von nur 1,1%, der Rest entfällt auf das leichtere  $^{12}\text{C}$ . Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Neutronen im Atomkern unterscheiden sich diese jeweils in ihrer molaren Masse voneinander, verhalten sich aber chemisch weitgehend gleich. Die Massenunterschiede sind jedoch verantwortlich für leicht veränderte Bindungs- und Vibrationsenergien (de Vries, 2005), welche verschiedene Isotopeneffekte zur Folge haben. Der Gleichgewichts-Isotopeneffekt sorgt in Gleichgewichtsreaktionen dafür, dass sich die Isotope eines Elements auf Grund unterschiedlicher Bindungsenergien nicht statistisch auf Produkte und Reaktanden verteilen. Hierbei erfolgt meist eine Anreicherung des schwereren Isotops in Verbindungen höherer molekularer Masse.

Durch den kinetischen Isotopeneffekt reagieren die Isotope eines Elements in einer Reaktion außerhalb des Gleichgewichtszustandes nicht mit der gleichen Rate. Da das leichtere Isotop eine höhere Vibrationsenergie besitzt, ist die Wahrscheinlichkeit mit dem Reaktionspartner zusammenzutreffen (Kollisionshäufigkeit) höher, so dass Produkte irreversibler Reaktionen generell an  $^{12}\text{C}$  angereichert sind. Bei den meisten biologischen Reaktionen handelt es sich nicht um Gleichgewichtsreaktionen, so dass fast ausschließlich kinetische Isotopeneffekte vorliegen. Allerdings kommen in diesem Fall auch noch andere Faktoren, wie die Membranpermeabilität der Zelle und die Gestaltung der Enzymtaschen, zur Geltung.

Diese Isotopeneffekte können allerdings alle nicht direkt beobachtet werden. Die Folge des Isotopeneffekts, die Isotopenfraktionierung, ist hingegen qualitativ messbar. Sie wird durch den Fraktionierungskoeffizienten  $\alpha$  beschrieben:

$$\alpha_{\text{S/P}} = \frac{R_{\text{S}}}{R_{\text{P}}} \quad (3.1)$$

wobei S das Substrat und P das Produkt einer Reaktion ist und R das Isotopenverhältnis  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

Für eine Reaktion ohne Fraktionierung der Isotopen würde  $\alpha$  theoretisch den Wert 1 annehmen. Wenn jedoch während der Reaktion das schwerere Isotop zu einem geringeren Anteil bzw. das leichtere Isotop zu einem größeren Anteil umgesetzt wird, nimmt  $\alpha$  einen Wert größer als 1 an. Im entgegengesetzten Fall, einer Bevorzugung des schwereren Isotops bzw. und einer Benachteiligung des leichteren Isotops, ergibt sich dann natürlich für  $\alpha$  ein Wert unter 1. Eine solche Kohlenstoffisotopenfraktionierung ist allerdings ungewöhnlich. Normalerweise ergibt sich bei unverzweigten irreversiblen Reaktionen auf Grund oben erwähnter Prinzipien ein Wert für  $\alpha$  größer als 1.

Bei einer irreversiblen Reaktion kann in einem geschlossenen System immer eine Fraktionierung durch den kinetischen Isotopeneffekt beobachtet werden (Abb. 3.4). Nach einer quantitativen Umsetzung des Substrats entspricht das Isotopenverhältnis des Produkts dem Ausgangsisotopenverhältnis des Substrats. Während des Ablaufs der Reaktion reichert sich durch die bevorzugte Umsetzung des leichteren  $^{12}\text{C}$  das schwerere Isotop  $^{13}\text{C}$  im verbleibenden Substrat an.

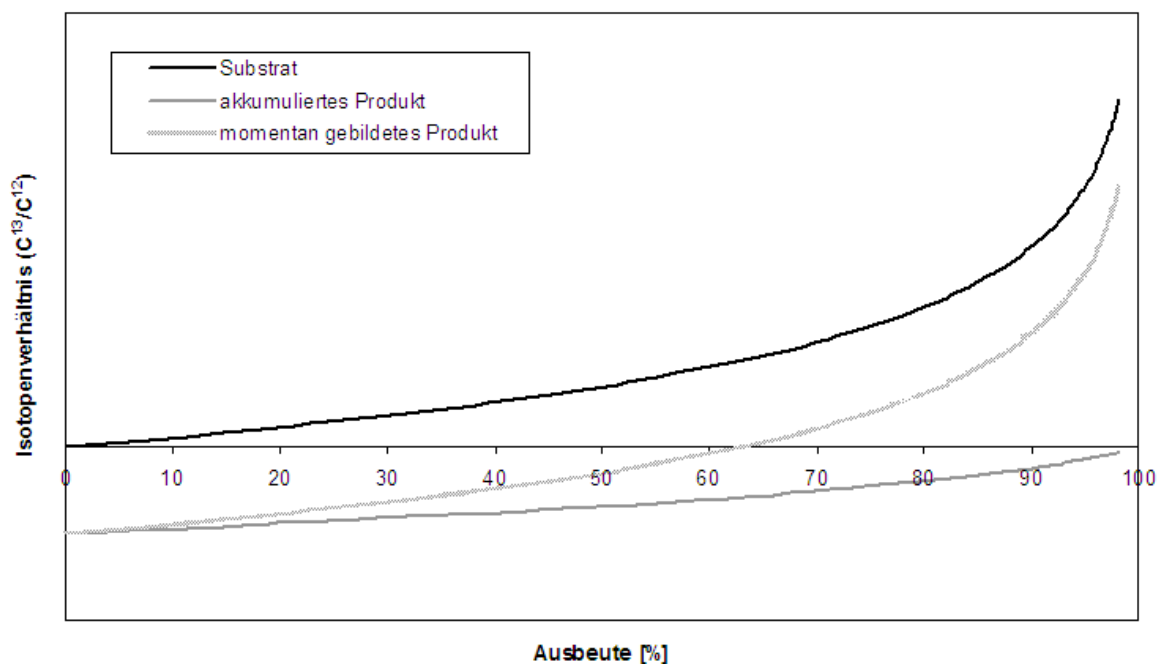


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der kinetischen Isotopenfraktionierung im geschlossenen System während des Ablaufs einer irreversiblen Reaktion.

Die Isotopenfraktionierung zwischen dem Anteil des Produkts, das momentan gebildet wird, und dem verbliebenen Substrat bleibt im Verlauf unverändert und entspricht der Größe des Isotopeneffekts. Daher sind die Kurven des Substrats und des momentan gebildeten Produkts immer durch dieselbe y-Differenz getrennt, wogegen die y-Differenz zwischen dem Substrat und dem akkumulierten Produkt stetig zunimmt (Hayes, 2002).

Aufgrund dessen, dass nur sehr kleine Änderungen der Isotopenverhältnisse während einer Reaktion beobachtet werden, wird bei der Betrachtung natürlicher Isotopenverhältnisse häufig die Delta-Notierung verwendet:

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{Probe}} / R_{\text{Standard}}) - 1] \times 10^3 [\text{‰}] \quad (4.2)$$

wobei R das Isotopenverhältnis  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  der Probe oder des verwendeten Standards ist. Es wurden Standard-Referenzmaterialien definiert, denen der willkürliche Wert 0‰ zugeordnet wurde (für Kohlenstoff ein Belemniten der PeeDee-Formation (Kalkstein) in den U.S.A.). Ein Anstieg des  $\delta$ -Wertes entspricht hierbei einem Anstieg des Anteils des schwereren Isotops.

### 3.4 Fraktionierungskoeffizienten und äußere Einflüsse

Es wird davon ausgegangen, dass die Fraktionierung der stabilen Kohlenstoffisotopen sehr charakteristisch für die verschiedenen Stoffwechselwege ist (Conrad, 2005; Elsner *et al.*, 2005). In neueren Studien, welche sich zumeist auf die beiden Hauptwege der Methanogenese beziehen, zeigte sich ein eher kleinerer Fraktionierungsbereich von -5‰ bis etwa -35‰ für die acetoklastische Methanogenese (Goevert and Conrad, 2009; Valentine *et al.*, 2004) und ein vergleichsweise breiter Fraktionierungsbereich von -28‰ bis etwa -79‰ für hydrogenotrophe Methanogene (Penning *et al.*, 2005; Valentine *et al.*, 2004). Allerdings können hierbei die sehr starken Fraktionierungen (unterhalb von -60‰) auf spät-logarithmische und stationäre Wachstumsphasen (Botz *et al.*, 1996) sowie auf Wasserstofflimitierung (Penning *et al.*, 2005) zurück geführt werden.

Die meisten Methanogenen haben lediglich die Möglichkeit über einen Stoffwechselweg Methan zu produzieren. *Methanosarcina barkeri* hingegen ist in der Lage über gleich vier verschiedene Stoffwechselwege Methan zu produzieren. Es stellt quasi den „Alleskönner“ der methanogenen Spezies dar. Dieser Organismus ist in der Lage sowohl auf Methanol unter Produktion von  $\text{CO}_2$  sowie mit Wasserstoff als Energiequelle aber auch auf Acetat oder  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  Methan zu produzieren (Welanders und Metcalf, 2005).

Eine vergleichende Studie mit *Methanosarcina barkeri* auf verschiedenen Substraten zeigte ebenfalls eine Substratabhängigkeit der Kohlenstoffisotopenfraktionierung (Krzycki *et al.*, 1987). Wobei die schwächste Fraktionierung auf Acetat mit  $\epsilon_{\text{CH}_4\text{-Acetat}} = -22\text{‰}$  und die stärkste Fraktionierung auf Methanol mit  $\epsilon_{\text{CH}_4\text{-Methanol}} = -79\text{‰}$  gemessen wurde. Die Fraktionierung für die hydrogenotrophe Methanogenese lag mit  $\epsilon_{\text{CH}_4\text{-H}_2/\text{CO}_2} = -49\text{‰}$  zwischen den Fraktionierungen der beiden anderen Stoffwechselwege.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde in einer weiteren Studie ebenfalls eine starke Fraktionierung von -81‰ bis -94‰ für eine mit Methylophilen angereicherte Kultur beobachtet (Rosenfeld und Silverman, 1959). Während allerdings die erste Studie ihre Daten aus einem offenen Gas-System mit Anfangs- und Endpunktmessungen bezog, wurde die zweite Studie lediglich in einer angereicherten statt in einer Reinkultur durchgeführt. Aber



diese Ergebnisse zeigen deutlich eine sehr starke Fraktionierung während der methylo trophen Methanogenese, was einen großen Einfluss auf die Isotopensignatur des gesamten emittierten Methans haben könnte.

Um allerdings die meist bei optimalen Wachstumsbedingungen erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten zur exakten Bestimmung der Stoffwechselwege einsetzen zu können, ist es wichtig ihre Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen zu bestimmen.

Einer der wichtigsten Umwelteinflüsse auf mikrobielle Lebensgemeinschaften stellt hierbei sicherlich die Temperatur dar. Mikroorganismen sind lediglich in einem für sie spezifischen Temperaturbereich wachstumsfähig. Bei zu geringen oder gar zu hohen Temperaturen kann auch das Überleben des Organismus gefährdet sein. Die optimale Wachstumstemperatur ist dann gegeben, wenn der Organismus die höchste Verdoppelungsrate erreicht. Die Wachstumsbereiche der Mikroorganismen reichen hierbei von unter 5°C (psychrophil) bis oberhalb von 105°C (hyperthermophil). Allerdings ist kein Organismus fähig in einem größeren Bereich dieses Temperaturfensters zu gedeihen. Mikroorganismen, welche in Warmblütern leben, wachsen zumeist am besten bei 37°C, Boden- und Wasserorganismen meist bei 25°C. Häufig kann ein Mikroorganismus bei der Temperatur am besten wachsen, welche auch in seinem natürlichen Lebensraum vorherrscht.

Die Temperatur kann hierbei auf unterschiedlichem Wege Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen nehmen. Zum einen nimmt die Geschwindigkeit von chemischen und enzymatischen Prozessen in der Zelle mit steigender Temperatur zu, allerdings werden oberhalb einer bestimmten Temperatur Proteine, Nukleinsäuren und andere zelluläre Bestandteile irreversibel denaturiert. Bei niedrigeren Temperaturen wird die Membran der Zelle zu steif und undurchlässig für Nährstoffe. (Brock und Madigan, 1991)

Dies bedeutet, dass in Lebensräumen, welche starken Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, die Organismen je nach vorherrschender Temperatur unterschiedlich aktiv sind. Während manche auf „Hochtouren“ arbeiten, befinden sich andere Organismen in einer Art „Winterruhe“.

Aber nicht nur saisonale Temperaturschwankungen haben einen direkten Einfluss auf mikrobielle Lebensgemeinschaften, sondern auch die globale Erwärmung kann diesen ausüben. Da sich die durchschnittliche Temperatur der Ozeane sogar bis in eine Tiefe von 3000 m erwärmt hat (IPCC, 2007), müssen sich auch hier mikrobielle Lebensgemeinschaften an die neuen Lebensumgebungen anpassen. Ein weiterer Effekt, welcher durch die Emission des Treibhausgases CO<sub>2</sub> ausgelöst wird, ist die „Versauerung der Meere“. Hierbei sinkt der pH-Wert als Folge der Aufnahme von CO<sub>2</sub> aus der Atmosphäre, da die Ozeane als natürlich Kohlenstoffsенke fungieren (Cao *et al.*, 2007; Torstensson *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit sollen daher die bisher noch nicht ausreichend bestimmten, aber für die Quantifizierung der methanogenen Reaktionswege benötigten Einflüsse auf die Fraktionierungskoeffizienten der Methanogenese in Reinkulturen bestimmt werden. Zusätzlich ist dies von entscheidender Bedeutung dafür ob und wie die unter

Laborbedingungen gewonnenen Daten von Reinkulturen auf Umweltproben übertragen werden können.

### 3.5 Ziele der Arbeit

Methan stellt aufgrund seines Treibhauspotentials und einem nicht geringen Anteil an den jährlichen Emissionen eines der wichtigsten Treibhausgase dar. Es entsteht unter anderem durch den Abbau von organischem Material in vielen anoxischen Habitaten. Im terrestrischen Bereich (Reisfeldböden und Feuchtgebiete) geschieht dies hauptsächlich durch acetoklastische und hydrogenotrophe Methanogenese. Darüber hinaus können allerdings auch einige methanogene Archaeen  $C_1$ -Substanzen als Substrat verwenden. Die Unterscheidung dieser Quellen des entstehenden Methans kann durch Beobachtung der Fraktionierung stabiler Kohlenstoffisotopen erfolgen. Da allerdings innerhalb der meisten Studien nur das Fraktionierungsverhalten von acetoklastischen und hydrogenotrophen Methanogenen unter Standardbedingungen untersucht wurde, soll in dieser Arbeit das Fraktionierungspotential methylotropher Methanogener näher untersucht werden sowie überprüft werden wie stark die Fraktionierung von äußeren Einflüssen abhängig ist:

- In welchem Bereich fraktionieren methylotrophe methanogene Archaeen gegenüber acetoklastischer und hydrogenotropher Methanogener in geschlossenen Systemen?
- Welchen Einfluss hat der Einsatz von Natriumcarbonat im Puffersystem auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung?
- Verändert die Gegenwart von Wasserstoff das Fraktionierungsverhalten während der Methanogenese in *Methanlobus zinderi*?
- Gibt es eine Temperaturabhängigkeit der Kohlenstoffisotopenfraktionierung?
- Welche Rolle spielt der pH-Wert bei der Fraktionierung stabiler Kohlenstoffisotope?
- Welchen Einfluss hat Methylfluorid auf die methylotrophe Methanogenese?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Sterilisationsverfahren

Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren (30 min bei 121°C und 200 kPa) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Bestandteile wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße, Whatman GmbH, Dassel) und unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Für Kulturen und Inkubationen verwendete Stopfen wurden vor Benutzung zur Entfernung des Weichmachers in Wasser autoklaviert (30 min bei 121°C und 200 kPa).

### 4.2 Chemikalien und Gase

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in p.a. Qualität von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Eppendorf AG (Hamburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Von der Firma Air Liquide (Düsseldorf) wurden folgende technische Gase eingesetzt. Als Eichgas für die GC-Messungen diente ein Gemisch aus CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> (1000 ppm) in Stickstoff sowie ein Gemisch aus H<sub>2</sub> (1000 ppm) in Stickstoff. Zur Begasung von Proben oder Kulturen wurde je nach Versuch ein N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gemisch (80/20%) oder ein H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gemisch (80/20%) verwendet (sechsfacher Austausch der Gasphase). Das für Inhibitionsversuche verwendete Methylfluorid wurde steril im angegebenen prozentualen Volumen der Serumflasche zugesetzt.

### 4.3 Mikroorganismen

Die verwendeten Kulturen *Methanothermobacter marburgensis* (Type Strain, DSM 2133), *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Type Strain, DSM 1053), *Methanosarcina acetivorans* (Type Strain, DSM 2834), *Methanosarcina barkeri* (Type Strain, DSM 800), *Methanlobus zinderi* (Type Strain, DSM 21339) und *Thermoanaerobacter kivui* (Type Strain, DSM 2030) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen.

### 4.4 Kultivierungsbedingungen

#### 4.4.1 Kultivierung von *Methanothermobacter marburgensis*

Für Stammhaltung und Reinkulturversuche von *Methanothermobacter marburgensis* dienten ein Minimal-Medium nach Schönheit *et al.* (1979) sowie ein hierauf basierendes, carbonatfreies Medium. Hierfür wurden die verwendeten Stoffe mit der Spurenelementlösung zusammen gegeben und auf das Endvolumen mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde mit Natronlauge ein pH von 7,0 eingestellt.

Für Batchversuche wurden die Kulturflaschen (120 ml) mit 50 ml Medium befüllt und mit Butylgummistopfen und Aluminiumkappe verschlossen. Die Gasphase wurde gegen ein  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80/20%)-Gemisch ausgetauscht. Im Anschluss wiesen die Serumflaschen einen Überdruck von 0,3 bar auf. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Nach Zugabe der Sulfidlösung wies das Medium einen pH-Wert von etwa 6,9 (carbonatfreies Medium) bzw. 7,3 (carbonathaltiges Medium) auf.

#### Carbonatfreies Minimal-Medium für *M. marburgensis*

6,8	g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
2,1	g	$\text{NH}_4\text{Cl}$
2,7	g	$\text{NaCl}$
1	ml	Spurenelementlösung
0,5	ml	Resazurin
3,6	ml	Sulfidlösung
Ad 1000	ml	$\text{H}_2\text{O}$ (bidest.)

#### Carbonathaltiges Minimal-Medium für *M. marburgensis*

6,8	g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
2,1	g	$\text{NH}_4\text{Cl}$
2,5	g	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
1	ml	Spurenelementlösung
0,5	ml	Resazurin
3,6	ml	Sulfidlösung
Ad 1000	ml	$\text{H}_2\text{O}$ (bidest.)

#### Spurenelementlösung (1000x) (1 ml/l)

2,87	g	NTA
4,07	g	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
0,5	g	$\text{FeCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
23,79	mg	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
24,2	mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
23,77	mg	$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
Ad 100	ml	$\text{H}_2\text{O}$ (bidest.)

#### Sulfidlösung (3,6 ml/l, 0,3 mM Endkonzentration)

1,25	g	$\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{ H}_2\text{O}$
62,5	ml	$\text{H}_2\text{O}$ (bidest.)

#### 4.4.2 Kultivierung von *Methanothermobacter thermautotrophicus*

Für Stammhaltung und Reinkulturversuche von *Methanothermobacter thermautotrophicus* diente das carbonathaltige Minimal-Medium, welches auch für *Methanothermobacter marburgensis* verwendet wurde (siehe 4.4.1).

#### 4.4.3 Kultivierung von *Methanosarcina acetivorans*

Für Stammhaltung und Reinkulturversuche von *Methanosarcina acetivorans* wurde das DSMZ-Medium 304 leicht modifiziert. Hierfür wurden die verwendeten Stoffe mit der Spurenelementlösung und Methanol zusammen gegeben und auf das Endvolumen mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde mit Salzsäure ein pH von 7,0 eingestellt.

Für Batchversuche wurden die Kulturflaschen (120 ml) mit 50 ml Medium befüllt und mit Butylgummistopfen und Aluminiumkappe verschlossen. Die Gasphase wurde gegen ein N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%)-Gemisch ausgetauscht. Im Anschluss wiesen die Serumflaschen einen Überdruck von 0,3 bar auf. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Nach Zugabe der Sulfidlösung wies das Medium einen pH-Wert von 7,1 auf.

Medium für *M. acetivorans*

23,4 g	NaCl
9,4 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
5,0 g	NaCO <sub>3</sub>
1,0 g	Hefeextrakt
1,0 g	NH <sub>4</sub> Cl
0,9 g	KCl
0,14 g	CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O
0,6 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10 ml	Spurenelementlösung
12,5 ml	Methanol
0,5 g	Cystein-HCl x H <sub>2</sub> O
1,8 ml	Sulfidlösung
Ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

Spurenelementlösung (100x) (10 ml/l)

1,5 g	Titriplex I
	pH auf 6,5 mit KOH (500 ml H <sub>2</sub> O)
0,1 g	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,1 g	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
0,1 g	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O

8,7	mg	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
10	mg	AlCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
10	mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
30	mg	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
19	mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>
Ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)
		pH auf 7,0 mit KOH

Sulfidlösung (1,8 ml/l, 0,15 mM Endkonzentration)

2,0	g	Na <sub>2</sub> S x 9H <sub>2</sub> O
80,0	ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

#### 4.4.4 Kultivierung von *Methanosarcina barkeri*

Für Stammhaltung und Reinkulturversuche von *Methanosarcina barkeri* wurde das DSMZ-Medium 120 leicht modifiziert. Hierfür wurden die verwendeten Stoffe mit der Spurenelementlösung und Methanol zusammen gegeben und auf das Endvolumen mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Für Batchversuche wurden die Kulturflaschen (120 ml) mit 50 ml Medium befüllt und mit Butylgummistopfen und Aluminiumkappe verschlossen. Die Gasphase wurde gegen ein N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%)-Gemisch ausgetauscht. Im Anschluss wiesen die Serumflaschen einen Überdruck von 0,3 bar auf. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Nach Zugabe der Sulfidlösung wies das Medium einen pH-Wert von 6,9 auf.

Medium für *M. barkeri*

0,25	g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,23	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,5	g	NH <sub>4</sub> Cl
0,5	g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
2,25	g	NaCl
2	mg	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
2,0	g	Hefeextrakt
2,0	g	Casitone
0,85	g	NaHCO <sub>3</sub>
1	ml	Spurenelementlösung SL-10
10	ml	Methanol
0,5	g	Cystein-HCl x H <sub>2</sub> O
1	ml	Vitaminlösung
1,8	ml	Sulfidlösung
Ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

## Spurenelementlösung SL-10 (1000x) (1 ml/l)

19,2 ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 M)
35 mg	ZnCl <sub>2</sub>
50 mg	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
3 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
95 mg	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
1,5 mg	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
13 mg	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
18 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
Ad 500 ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

## Vitaminlösung (1000x) (1 ml/l)

2 mg	Biotin
2 mg	Folsäure
10 mg	Pyridoxin-HCl
5 mg	Thiamin-HCl
5 mg	Riboflavin (B <sub>2</sub> )
5 mg	Nikotinsäure
5 mg	Pantothensäure
Spuren	Vitamin B <sub>12</sub>
5 mg	<i>p</i> -Aminobenzoessäure
5 mg	Liponsäure
3 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
Ad 100 ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

## Sulfidlösung (1,8 ml/l, 0,15 mM Endkonzentration)

2,0 g	Na <sub>2</sub> S x 9H <sub>2</sub> O
80,0 ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

**4.4.5 Kultivierung von *Methanlobus zinderi***

Für Stammhaltung und Reinkulturversuche von *Methanlobus zinderi* wurde das DSMZ-Medium 324 leicht modifiziert. Hierfür wurden die verwendeten Stoffe mit der Spurenelementlösung und Methanol zusammen gegeben und auf das Endvolumen mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Für Batchversuche wurden die Kulturflaschen (120 ml) mit 50 ml Medium befüllt und mit Butylgummistopfen und Aluminiumkappe verschlossen. Die Gasphase wurde gegen ein N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%)-Gemisch bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%)-Gemisch ausgetauscht (abhängig von der Versuchsgestaltung). Im Anschluss wiesen die Serumflaschen einen Überdruck von 0,3 bar

auf. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Nach Zugabe der Sulfidlösung wies das Medium einen pH-Wert von 7,0 auf.

Medium für *M. zinderi*

0,33 g	KCl
4 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
3,5 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,25 g	NH <sub>4</sub> Cl
0,14 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
18 g	NaCl
2 mg	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
1 g	Natriumacetat
2,0 g	Hefeextrakt
2,0 g	Trypton/Pepton aus Casein
5 g	NaHCO <sub>3</sub>
10 ml	Spurenelementlösung
5 ml	Methanol
0,5 g	Cystein-HCl x H <sub>2</sub> O
1 ml	Vitaminlösung
1,8 ml	Sulfidlösung
Ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

Spurenelementlösung (100x) (10 ml/l)

1,5 g	Titriplex I
	pH auf 6,5 mit KOH (500 ml H <sub>2</sub> O)
0,1 g	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,1 g	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
0,1 g	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
8,7 mg	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
10 mg	AlCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
10 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
30 mg	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
19 mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>
Ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)
	pH auf 7,0 mit KOH

Vitaminlösung (1000x) (1 ml/l)

2 mg	Biotin
2 mg	Folsäure



10 mg	Pyridoxin-HCl
5 mg	Thiamin-HCl
5 mg	Riboflavin (B <sub>2</sub> )
5 mg	Nikotinsäure
5 mg	Pantothensäure
Spuren	Vitamin B <sub>12</sub>
5 mg	<i>p</i> -Aminobenzoesäure
5 mg	Liponsäure
3 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
Ad 100 ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

Sulfidlösung (1,8 ml/l, 0,15 mM Endkonzentration)

2,0 g	Na <sub>2</sub> S x 9H <sub>2</sub> O
80,0 ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

#### 4.4.6 Kultivierung von *Thermoanaerobacter kivui*

Für die Stammhaltung und Reinkulturversuchen von *Thermoanaerobacter kivui* wurde das DSMZ-Medium 171 leicht modifiziert. Hierfür wurden die verwendeten Stoffe mit der Spurenelementlösung zusammen gegeben und auf das Endvolumen mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Für Batchversuche wurden die Kulturflaschen (120 ml) mit 50 ml Medium befüllt und mit Butylgummistopfen und Aluminiumkappe verschlossen. Die Gasphase wurde gegen ein H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%)-Gemisch ausgetauscht. Im Anschluss wiesen die Serumflaschen einen Überdruck von 0,3 bar auf. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und die Vitamin- sowie die Sulfidlösung hinzugegeben.

Medium für *T. kivui*

0,11 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,11 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,25 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
1,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
0,16 g	NH <sub>4</sub> Cl
0,11 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,23 g	NaCl
0,045 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
2 mg	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
10 ml	Spurenelementlösung
0,5 ml	Resazurin
0,5 g	Cystein-HCl x H <sub>2</sub> O

0,25	ml	Vitaminlösung
1,8	ml	Sulfidlösung
Ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

## Spurenelementlösung (100x) (10 ml/l)

1,5	g	Titriplex I
		pH auf 6,5 mit KOH (500 ml H <sub>2</sub> O)
0,1	g	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,1	g	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
0,1	g	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
8,7	mg	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
10	mg	AlCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
10	mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
30	mg	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
19	mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>
Ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)
		pH auf 7,0 mit KOH

## Vitaminlösung (4000x) (0,25 ml/l)

2	mg	Biotin
2	mg	Folsäure
10	mg	Pyridoxin-HCl
5	mg	Thiamin-HCl
5	mg	Riboflavin (B <sub>2</sub> )
5	mg	Nikotinsäure
5	mg	Pantothensäure
Spuren		Vitamin B <sub>12</sub>
5	mg	<i>p</i> -Aminobenzoessäure
5	mg	Liponsäure
3	g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
Ad 100	ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

## Sulfidlösung (1,8 ml/l, 0,15 mM Endkonzentration)

1,25	g	Na <sub>2</sub> S x 9H <sub>2</sub> O
62,5	ml	H <sub>2</sub> O (bidest.)

#### 4.4.7 Temperaturkontrolle

##### 4.4.7.1 Inkubatoren, Klimaräume

Die Inkubation der verwendeten Kulturen fand in Inkubatoren der Firmen WTB Binder (Tuttlingen), Heraeus Instruments (Osterode) sowie in komplett klimatisierten Räumen statt.

##### 4.4.7.2 „Temperaturorgel“

Zur Erzeugung einer höheren Auflösung bezüglich der Temperatur wurde eine so genannte „Temperaturorgel“ verwendet. Der Kern bestand aus einem 195x15x15 cm großen Eisenblock. Dieser wies 31 nebeneinander liegende Bohrungen für Reagenzglasröhrchen auf, welche mit 5 ml Medium gefüllt wurden. Isoliert gegenüber der Umgebung wurde der Block von einer 7 cm dicken Schicht aus Styropor sowie durch Sperrholzplatten. Durch an den Enden angelegte Heizung sowie Kühlung konnte innerhalb des Blocks ein Temperaturgradient aufgebaut werden.

#### 4.5 Chemische Analysen

##### 4.5.1 Quantitative chromatographische Analysen

Vor der Gasanalyse wurden die Kulturen kurz von Hand geschüttelt, um ein Gleichgewicht zwischen Medium und Gasphase herzustellen. Die Gasproben wurden mit einer 0,5 ml Pressure-Lock-Spritze (VICI, Baton Rouge, LA, USA) unmittelbar vor der Analyse steril durch das Septum entnommen. Das Probenvolumen betrug 0,02 - 0,1 ml in Abhängigkeit des Methangehalts der Probe. Hierbei wurden GC- sowie GC-IRMS-Proben für Methan und CO<sub>2</sub> üblicherweise separat gemessen. Lediglich die quantitative Analyse während der Versuche auf Methanol erfolgte ausschließlich über die durch GC-IRMS-Messungen erhaltenen Ergebnisse. Die quantitative Analyse von Acetat sowie von Methanol erfolgte ebenfalls ausschließlich über GC-IRMS-Messungen. Die quantitative Analyse von elementarem Wasserstoff fand jederzeit durch einfache gaschromatographische Messungen statt.

##### 4.5.1.1 Analyse von Methan und CO<sub>2</sub>

Die quantitative Bestimmung von Methan und CO<sub>2</sub> erfolgte wie beschrieben mit einem Gaschromatographen GC-8A (Shimadzu), ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor (FID).

Injektor:	Betriebstemperatur: 160°C
Trägergas:	Wasserstoff 5,0
Säule:	Edelstahlsäule, 3 m Länge, 1/8 Zoll Durchmesser
	Trägermaterial: Hayesep Q 80/100 mesh

	Betriebstemperatur: 120°C
Methanisator:	Zur Bestimmung von oxidierten Gasen (z.B. CO <sub>2</sub> wird zu CH <sub>4</sub> reduziert); Eigenbau Säule: NiCr-Ni-Katalysator (Chrompack, Middelburg, Niederlande), Edelstahlsäule, Länge 20 cm, Innendurchmesser: 1/8 Zoll Betriebstemperatur: 350°C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID) Brenngas: Wasserstoff und FID-Gas Quenchgas: Stickstoff 5,0 Betriebstemperatur: 160°C
Nachweisgrenze:	1 ppmv CH <sub>4</sub>
Auswertung:	PeakSimple Chromatography Data System (SRI Instruments)
Eichgas:	Gemisch aus CH <sub>4</sub> (1002 ppmv) und CO <sub>2</sub> (1000 ppmv) in Stickstoff

#### 4.5.1.2 Analyse von Wasserstoff

Die Bestimmung von Wasserstoff erfolgte mit einem Gaschromatographen GC-8A (Shimadzu), ausgestattet mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD).

Injektor:	Betriebstemperatur: 120°C
Trägergas:	Stickstoff 5,0
Säule:	Edelstahlsäule, 2 m Länge, 1/8 Zoll Durchmesser Trägermaterial: Hayesep Q 80/100 mesh Betriebstemperatur: 80°C
Detektor:	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) Betriebstemperatur: 120°C
Nachweisgrenze:	1 ppmv H <sub>2</sub>
Auswertung:	PeakSimple Chromatography Data System (SRI Instruments)
Eichgas:	H <sub>2</sub> (998 ppmv) in Stickstoff

#### 4.5.2 Stabile Kohlenstoff-Isotopenverhältnismessung

Stabile Isotopenhäufigkeiten werden in dieser Arbeit in der üblichen  $\delta$ -Notierung dargestellt. Hierbei wird der relative Unterschied des Isotopenverhältnisses ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) der Probe zu einem internationalen Standard in ‰ ausgedrückt. Der Standard für Kohlenstoff-Isotopenverhältnismessungen ist gemäß internationaler Übereinkunft der Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) mit einem  $R_{\text{standard}} = 11180,2 \times 10^{-6} \pm 2,8 \times 10^{-6}$  (siehe auch Gleichung 4.2).

#### 4.5.2.1 Methan und CO<sub>2</sub>

Die stabile Isotopensignatur von CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> wurde je nach zeitlicher Verfügbarkeit mit einem von zwei Gaschromatographen mit Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (GC-C-IRMS, Thermo Electron, Bremen) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode wurde von Brand (1996) beschrieben.

GC:	Hewlett Packard 6890 (HP, Waldbronn)
Injektor:	Splitverhältnis 1:10; Betriebstemperatur: 150°C
Trärgas:	Helium 5,0; Flussrate 2,6 ml min <sup>-1</sup>
Säule:	Pora PLOT Q, 27,5 m Länge; 0,32 mm Durchmesser; Filmdicke 10 µm (Crompack, Frankfurt)
Ofentemperatur:	30°C
GC/C-Interface:	Standard GC Combustion Interface III (Thermo Electron, Bremen) Oxidations-Reaktor bei 940°C Reduktions-Reaktor bei 650°C
Detektor:	IRMS: Finnigan MAT Delta <sup>plus</sup> (Thermo Electron, Bremen)
Auswertung:	ISODAT <sup>TM</sup> NT 2.0 (Thermo Electron, Bremen)
Referenzgas:	CO <sub>2</sub> 4,8 (Reinheitsgrad 99,998%; Air Liquide, Düsseldorf) Das Referenzgas wurde mit dem Arbeitsstandard Methylstearat (Merck) kalibriert. Methylstearat wurde am Max-Planck-Institut für Biogeochemie (Jena) gegen die internationalen Standardmaterialien NBS22 und USGS24 geeicht (Dank an Dr. W.A. Brand).

Die Präzision bei wiederholter Injektion von 1,3 nmol CH<sub>4</sub> betrug ± 0,2‰ (Penning, 2006).

GC:	Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Bremen)
Injektor:	Splitverhältnis 1:10; Betriebstemperatur: 150°C
Trärgas:	Helium 5,0; Flussrate 2,6 ml min <sup>-1</sup>
Säule:	Pora PLOT Q, 27,5 m Länge; 0,32 mm Durchmesser; Filmdicke 10 µm (Varian, Palo Alto, CA, USA)
Ofentemperatur:	30°C
GC/C-Interface:	GC Isolink 1030 (Thermo Fisher Scientific, Bremen) Oxidations-Reaktor bei 940°C
Detektor:	IRMS: Delta V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Bremen)
Auswertung:	ISODAT <sup>TM</sup> NT 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Bremen)
Referenzgas:	CO <sub>2</sub> 4,8 (Reinheitsgrad 99,998%; Air Liquide, Düsseldorf) Das Referenzgas wurde mit dem Arbeitsstandard Methylstearat (Merck) kalibriert. Methylstearat wurde am Max-Planck-Institut für

Biogeochemie (Jena) gegen die internationalen Standardmaterialien NBS22 und USGS24 geeicht (Dank an Dr. W.A. Brand).

Die Präzision bei wiederholter Injektion von 1,0 nmol CH<sub>4</sub> betrug  $\pm 0,13\%$  (Testmessung bei Installation).

#### 4.5.2.2 Methanol

Die Kohlenstoffverbindungen der wässrigen Lösungen wurden ebenfalls über einen Gaschromatographen mit Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (GC-C-IRMS, Thermo Electron, Bremen) bestimmt. Hierfür wurde 1  $\mu$ l der Lösung in flüssiger Form in den Gaschromatographen injiziert und im Injektor zur Trennung verdampft. Anschließend wurde die Säule bis auf 220°C aufgeheizt, um alle Bestandteile der injizierten Lösung von der Säule zu lösen. Eine ähnliche Methode wurde von Conrad und Claus (Conrad und Claus, 2005) beschrieben.

GC:	Hewlett Packard 6890 (HP, Waldbronn)
Injektor:	Splitverhältnis 1:40; Betriebstemperatur: 240°C
Trärgas:	Helium 5,0; Flussrate 2,6 ml min <sup>-1</sup>
Säule:	forte BP20, 25 m Länge; 0,32 mm Durchmesser; Filmdicke 0,5 $\mu$ m (SGE, Ringwood, Victoria, Australia)
Ofentemperatur:	50°C, 10°C min <sup>-1</sup> bis 140°C, 20°C min <sup>-1</sup> bis 220°C, 220°C für 1 min
GC/C-Interface:	Standard GC Combustion Interface III (Thermo Electron, Bremen) Oxidations-Reaktor bei 940°C Reduktions-Reaktor bei 650°C
Detektor:	IRMS: Finnigan MAT Delta plus (Thermo Electron, Bremen)
Auswertung:	ISODAT™ NT 2.0 (Thermo Electron, Bremen)
Referenzgas:	CO <sub>2</sub> 4,8 (Reinheitsgrad 99,998%; Air Liquide, Düsseldorf) Das Referenzgas wurde mit dem Arbeitsstandard Methylstearat (Merck) kalibriert. Methylstearat wurde am Max-Planck-Institut für Biogeochemie (Jena) gegen die internationalen Standardmaterialien NBS22 und USGS24 geeicht (Dank an Dr. W.A. Brand).

#### 4.5.2.3 Acetat

Die Kohlenstoffverbindungen der wässrigen Lösungen wurden über HPLC aufgetrennt und anschließend mit Natriumperoxodisulfat (0,42 M; Fluka) und Phosphorsäure (1,35 M; Merck) bei 99,9°C vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert. CO<sub>2</sub> wurde über eine Membran in einen Heliumstrom überführt und zum IRMS weitergeleitet. Das Prinzip dieser Methode wurde von Krummen *et al.* (2004) beschrieben.

Probenaufgeber:	HTC Pal (CTC Analysis, Zwingen, Schweiz)
HPLC-Anlage:	Pumpe Spectra System P1000 (Thermo Finnigan, Jan Jose, CA, USA), Säulenofen Mistral (Spark, Emmen, Niederlande),
Trägermaterial:	Sulfuriertes Divinyl-Benzol-Styren (Aminex HPX-87-H, Biorad)
Fließmittel:	1 mM Schwefelsäure, Flussrate: 0,3 ml min <sup>-1</sup>
Säule:	Edelstahlsäule, 30 cm Länge, 7,8 mm Durchmesser
Oxidationsreagentien:	Natriumperoxodisulfatlösung und Phosphorsäure; Flussrate jeweils 50 µl min <sup>-1</sup>
Ofentemperatur:	35°C
Interface:	Finnigan LC IsoLink (Thermo Electron, Bremen)
Detektor:	IRMS: Finnigan MAT delta plus advantage (Thermo Electron, Bremen)
Auswertung:	ISODAT™ NT 2.0 (Thermo Electron, Bremen)
Referenzgas:	CO <sub>2</sub> 4,8 (Reinheitsgrad 99,998%; Air Liquide, Düsseldorf) Das Referenzgas wurde mit dem Arbeitsstandard Methylstearat (Merck, Darmstadt) kalibriert. Methylstearat wurde am Max-Planck- Institut für Biogeochemie (Jena) gegen die internationalen Standardmaterialien NBS22 und USGS24 geeicht (Dank an Dr. W.A. Brand).

### 4.5.3 Bestimmung des pH-Wertes

Für die Bestimmung des pH-Wertes wurde ein digitales pH-Meter (Microprozessor pH Meter 539, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit einer pH-Sonde (InLab 412, pH 0 bis 14, Mettler Toledo, Gießen) verwendet.

### 4.5.4 Berechnungen

#### 4.5.4.1 Stoffmenge von Gasen

Die gemessenen Konzentrationen (ppmv) wurden in Stoffmengen (mmol) umgerechnet. Dafür wurde die Zustandsgleichung idealer Gase nach der Stoffmenge  $n$  aufgelöst:

$$n = \frac{p \times V}{R \times T} \quad (4.1)$$

$n$ : Stoffmenge [mol]

$p$ : Partialdruck des gemessenen Gases [bar] (1 ppmv = 10<sup>-6</sup> bar)

$V$ : Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]

$R$ : allgemeine Gaskonstante (0,083144 l bar K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>)

$T$ : Temperatur [K]

#### 4.5.4.2 Isotopenfraktionierung

Der Fraktionierungskoeffizient  $\alpha_{A/B}$  einer Reaktion  $A \rightarrow B$  wurde nach Hayes (1993) definiert (analog zu Gleichung 3.1, aber unter Verwendung der Deltanotation an Stelle von Isotopenverhältnissen):

$$\alpha_{A/B} = (\delta_A + 1000)/(\delta_B + 1000) \quad (4.2)$$

Dabei ist  $\delta$  der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert vom Reaktanden A bzw. Produkt B. Isotopenfraktionierung wird häufig auch als  $\varepsilon$  angegeben ( $\varepsilon \equiv 10^3 (1-\alpha)$ ).

Unter Annahme eines unendlich großen Substratreservoirs oder eines Fließgleichgewichts kann der Fraktionierungskoeffizient wie in Gleichung 4.2 bestimmt werden. In geschlossenen Systemen kann der Fraktionierungskoeffizient  $\varepsilon$  mit folgenden Näherungsgleichungen nach Mariotti *et al.* (1981), die auf einer Rayleigh Destillation basieren, aus dem Anteil des verbrauchten Reaktanden ( $f$ ) und der Isotopensignatur des Produkts (Gleichung 4.3) bzw. des Reaktanden (Gleichung 4.4) bestimmt werden.

$$\delta_p = \delta_{ri} - \varepsilon (1-f)[\ln(1-f)]/f \quad (4.3)$$

$$\delta_r = \delta_{ri} + \varepsilon [\ln(1-f)] \quad (4.4)$$

Mit  $\delta_{ri} = \delta^{13}\text{C}$ -Wert des Reaktanden zu Beginn ( $f = 0$ );  $\delta_p$  und  $\delta_r$  sind die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Produkts bzw. des Reaktanden zu dem Zeitpunkt, an dem  $f$  bestimmt wurde. Graphisch kann  $\varepsilon$  durch lineare Regression von  $\delta_p$  gegen  $(1-f)[\ln(1-f)]/f$  oder  $\delta_r$  gegen  $\ln(1-f)$  als Steigung bestimmt werden.

Zur Berechnung der verbrauchten Reaktanden kann die Methode nach Gelwicks *et al.* (1989) eingesetzt werden. Hierbei wird darauf verzichtet diese über die Stoffmengen zu bestimmen, sondern es werden lediglich die gemessenen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte dazu verwendet.

$$f = (\delta_{si} - \delta_{sf})/(\delta_{pf} - \delta_{sf}) \quad (4.5)$$

Hierbei steht  $\delta_{si}$  für den Delta-Wert des Substrats zu Beginn der Reaktion,  $\delta_{sf}$  für den Delta-Wert des Substrats zum gemessenen Zeitpunkt und  $\delta_{pf}$  für den Delta-Wert des Produkts zum gemessenen Zeitpunkt.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kohlenstoffisotopenfraktionierung verschiedener Stoffwechselwege

Bevor die Auswirkungen äußerer Einflüsse auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung untersucht werden konnten, mussten zunächst Fraktionierungskoeffizienten bei optimalen Wachstumsbedingungen, wie sie in der Literatur für die einzelnen Organismen beschrieben sind, bestimmt werden. Hierfür wurden die Konzentrationen von Substraten und Produkten sowie deren Isotopensignaturen während der Inkubation gemessen. Um auch Substratabhängigkeiten bei der Kohlenstoffisotopenfraktionierung besser zu verstehen, wurden sowohl hydrogenotrophe als auch methylotrophe methanogene Archaeen ausgewählt. Ein homoacetogenes Bakterium diente zusätzlich als Vergleichsorganismus gegenüber den hydrogenotrophen Methanogenen beim Wachstum auf  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  als Substrat.

#### 5.1.1 Isotopenfraktionierung in hydrogenotrophen methanogenen Archaeen

##### 5.1.1.1 Isotopenfraktionierung in *Methanothermobacter marburgensis*

*Methanothermobacter marburgensis* setzte im carbonatfreien Medium während des Fermentationsprozesses das konsumierte  $\text{CO}_2$  und den konsumierten Wasserstoff nach bekannter Stöchiometrie (Schema 3.1) zu Methan um (Abb. 5.1). Die Abbildung zeigt allerdings nur die Stoffmenge des  $\text{CO}_2$ , welche in der Gasphase der Serumflasche gemessen wurde. Die Gesamtkonzentration der für die Reaktion zur Verfügung stehendem anorganischem Kohlenstoff war aufgrund von gelöstem  $\text{CO}_2$  sowie Hydrogencarbonat im Medium höher (0,6 mmol).

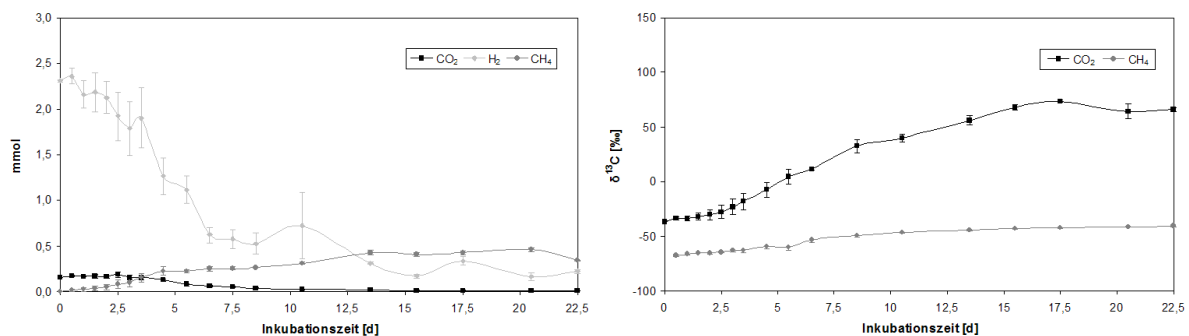


Abbildung 5.1: Konzentrationen (links) und Kohlenstoffisotopensignaturen (rechts) der Substrate und Produkte während der hydrogenotrophen Methanogenese in *M. marburgensis* bei 65°C (carbonatfreies Medium).

Durch den bevorzugten Verbrauch von „leichtem“  $^{12}\text{C}$ - $\text{CO}_2$ , konnte die erwartete Anreicherung von „schwerem“  $^{13}\text{C}$  im verbleibenden  $\text{CO}_2$  beobachtet werden. Aufgrund des nun vermehrten Vorkommens von „schwerem“  $\text{CO}_2$  im Medium kam es ferner zu einer ansteigenden Produktion von „schwerem“  $^{13}\text{C}$ -Methan (Abb. 5.1).

Zuvor durchgeführte Studien beschrieben für die logarithmische Phase der hydrogenotrophen Methanogenese von *M. marburgensis* in offenen Systemen eine Fraktionierung von etwa -30‰ (Fuchs *et al.*, 1979; Valentine *et al.*, 2004). Die Ergebnisse des Wachstumsversuchs mit *M. marburgensis* im geschlossenen System ohne Substratlimitierung zeigten, dass sich die in offenen Systemen erhaltenen Daten in diesem Fall übertragen lassen. Durch lineare Regression in den Mariotti-Plots ergaben sich Fraktionierungskoeffizienten von  $\epsilon_{\text{CO}_2} = -33,9\text{‰}$  und  $\epsilon_{\text{CH}_4} = -30,9\text{‰}$  (Abb. 5.2).

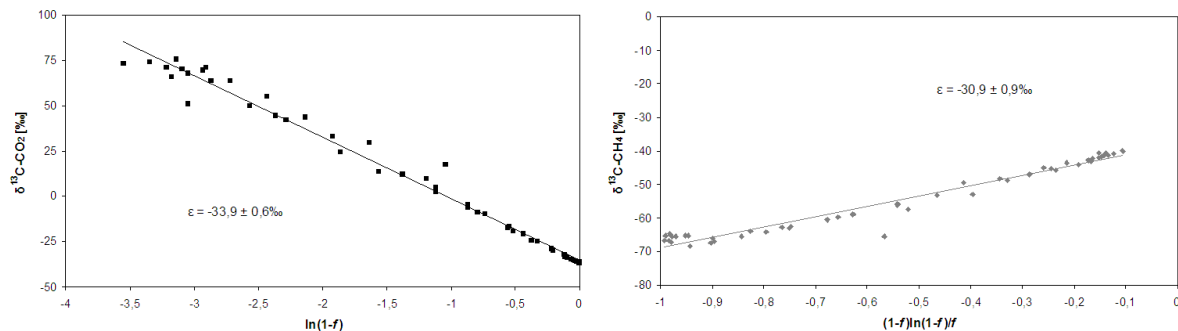


Abbildung 5.2: Mariotti-Plots für  $\text{CO}_2$  und Methan für *M. marburgensis* bei 65°C (carbonatfreies Medium). Die Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden durch lineare Regression bestimmt (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

#### 5.1.1.2 Einfluss des Puffersystems auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung

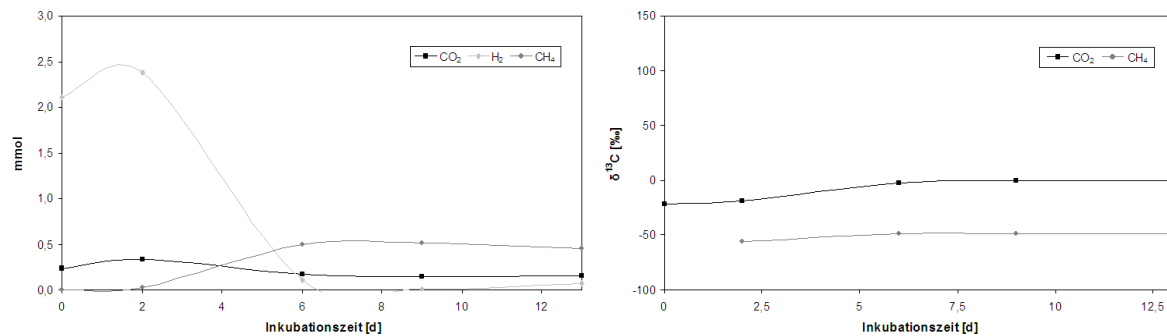


Abbildung 5.3: Konzentrationen (links) und Kohlenstoffisotopensignaturen (rechts) der Substrate und Produkte während der hydrogenotrophen Methanogenese in *M. marburgensis* bei 65°C (carbonathaltiges Medium).

Bei einer Wiederholung des vorherigen Versuchs im für die Stammhaltung eingesetzten carbonathaltigen Medium nach Schönheit *et al.* (1979) konnten die zuvor beobachteten Ergebnisse zum Teil bestätigt werden (Abb. 5.3). Durch das zusätzlich eingesetzte Natriumcarbonat wurde allerdings die Konzentration eines der beiden Substrate fast verdreifacht (1,78 mmol). Dies zeigt sich auch in den Ergebnissen der gaschromatographischen Messungen, in welchen die gemessene Konzentration von  $\text{CO}_2$  im Gasraum höher ist als beim Versuch im carbonatfreien Medium. Aufgrund dessen stellt Wasserstoff den limitierenden Faktor der Reaktion dar, da die Stöchiometrie von 4:1

zwischen Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid weiterhin eingehalten wurde. Ebenfalls konnte hier auch wieder ein bevorzugter Verbrauch von leichtem  $^{12}\text{C}\text{-CO}_2$  wie auch die mit Dauer der Reaktion zunehmende Produktion von „schwererem“  $^{13}\text{C}\text{-Methan}$  beobachtet werden. Jedoch fiel die Veränderung der Kohlenstoffisotopie mit einem Anstieg von 20‰ beim  $\text{CO}_2$  und einem Anstieg von 10‰ beim Methan geringer aus als im vorherigen Versuch (Abb. 5.3).

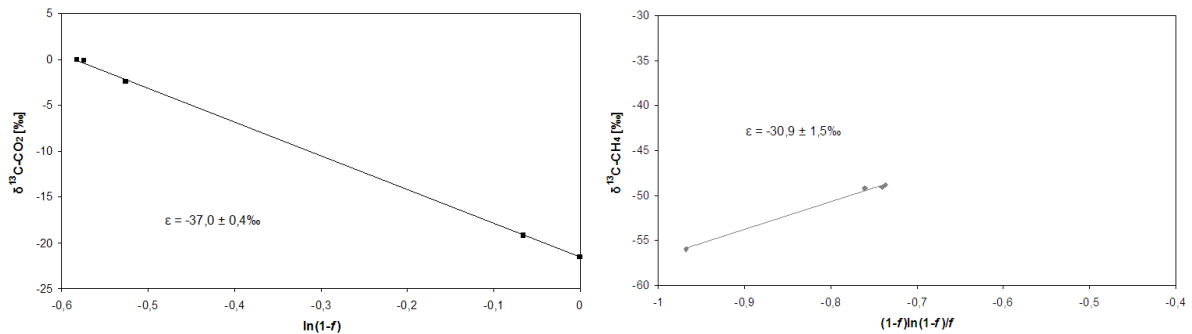


Abbildung 5.4: Mariotti-Plots für  $\text{CO}_2$  und Methan für *M. marburgensis* bei  $65^\circ\text{C}$  (carbonathaltiges Medium). Die Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden durch lineare Regression bestimmt.

Mit einem Fraktionierungskoeffizienten von  $\epsilon_{\text{CH}_4} = -30,9\text{‰}$  wurde für die Berechnung über das Produkt der Wert, der auch im carbonatfreien Medium erhalten wurde, bestätigt. Der aus den Substratdaten ermittelte Fraktionierungskoeffizient lag hingegen mit  $\epsilon_{\text{CO}_2} = -37,0\text{‰}$  unter dem Wert, der im carbonatfreien Medium erhalten wurde (Abb. 5.4). Allerdings zeigten sowohl die Ergebnisse der GC-Messungen als auch der nach Gelwicks *et al.* (1989) ermittelte Substratverbrauch ( $f_{\text{delta}}$ ), dass nach dem Verbrauch des gesamten vorgelegten Wasserstoffs lediglich 45% des insgesamt eingesetzten anorganischen Kohlenstoffs verbraucht wurden, da durch die Zugabe des Natriumcarbonats das stöchiometrische Verhältnis der beiden Substrate zueinander, welches im carbonatfreien Medium gegeben war, aufgehoben wurde. Durch eine Verkleinerung des Beobachtungsfensters im carbonatfreien Medium auf einen Substratverbrauch bis zu 45% konnte mit  $\epsilon_{\text{CO}_2} = -35,3\text{‰}$  ein ähnlicher Fraktionierungskoeffizient wie im carbonathaltigen Medium erhalten werden (Abb. 5.5).

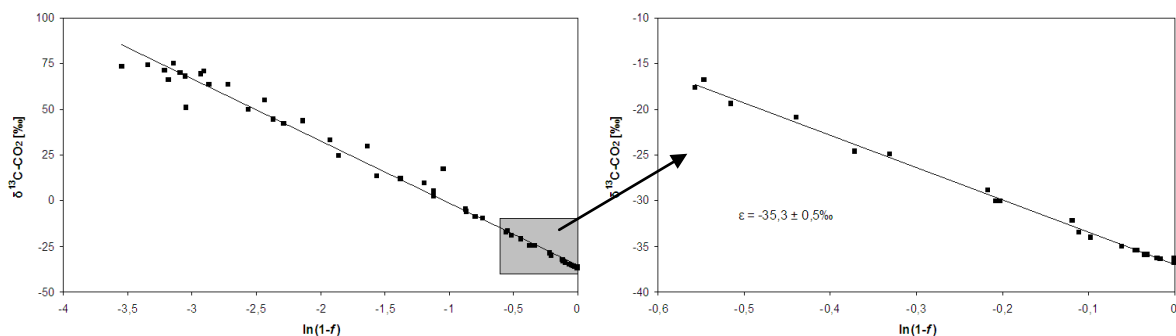


Abbildung 5.5: Mariotti-Plot für  $\text{CO}_2$  für *M. marburgensis* bei  $65^\circ\text{C}$  (carbonatfreies Medium). Der Fraktionierungskoeffizient ( $\epsilon$ ) wurde durch lineare Regression für einen Substratverbrauch von bis zu 45% bestimmt (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

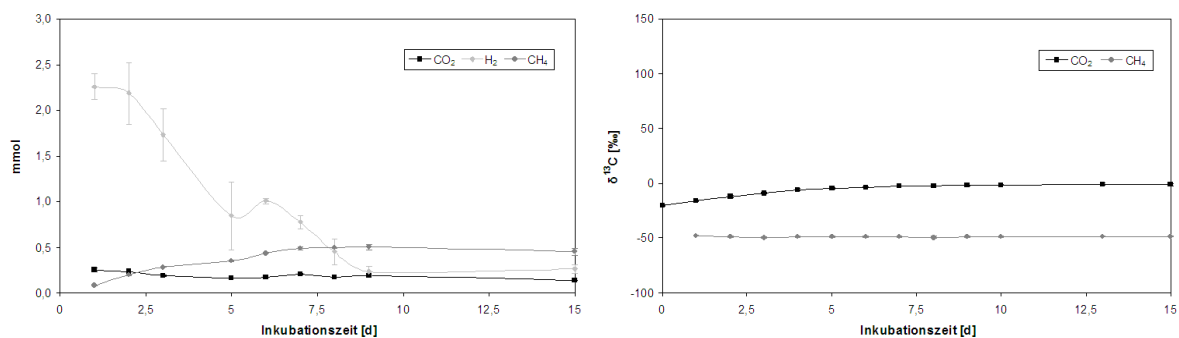
Für die acetoklastische Methanogenese wurde bereits gezeigt, dass die Fraktionierung im Substrat mit fortschreitender Reaktionsdauer abnimmt (Goevert und Conrad, 2009). Dieses Verhalten zeigt sich ebenfalls für die hydrogenotrophe Methanogenese (Tab. 5.1).

Der Anteil an  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  nimmt mit fortdauernder Reaktion weniger stark zu, da immer weniger „leichtes“  $^{12}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  für die Reaktion zur Verfügung steht und somit auch vermehrt das „schwerere“  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  an der Reaktion teilnimmt. Dies erklärt auch die leicht höhere Fraktionierung im carbonathaltigen Medium, da aufgrund des verfrühten Reaktionsabbruchs über die gesamte Dauer der stattfindenden Reaktion eine ausreichende Menge  $^{12}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  zur Verfügung steht, um eine gleich bleibend hohe Diskriminierung von  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  zu gewährleisten. Da somit aber in der Anfangsphase vorwiegend „leichtes“  $^{12}\text{C}$ -Methan gebildet wird, kann für Methan erst gegen Ende der Reaktion eine stärkere Änderung der Kohlenstoffisotopensignatur beobachtet werden. Im carbonathaltigen Medium konnte diese geringe Fraktionierung allerdings nicht durch die lineare Regression im Mariotti-Plot bestätigt werden.

*Tabelle 5.1:* Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) für die hydrogenotrophe Methanogenese in *M. marburgensis* bei 65°C in Abhängigkeit des Reaktionsfortschritts ( $f$ ).

	$f$	$\epsilon_{\text{CO}_2}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
<i>carbonatfreies Medium</i>	0,0 - 1,0	$-33,9 \pm 0,6$	$-30,9 \pm 0,9$
	0,0 - 0,5	$-35,3 \pm 0,5$	$-13,2 \pm 3,2$
	0,5 - 0,8	$-31,1 \pm 7,8$	$-38,3 \pm 12,1$
	0,8 - 1,0	$-27,9 \pm 2,6$	$-40,1 \pm 1,8$
<i>carbonathaltiges Medium</i>	0,0 - 0,5	$-37,0 \pm 0,4$	$-30,9 \pm 1,5$

### 5.1.1.3 Isotopenfraktionierung in *Methanothermobacter thermautotrophicus*



*Abbildung 5.6:* Konzentrationen (links) und Kohlenstoffisotopensignaturen (rechts) der Substrate und Produkte während der hydrogenotropen Methanogenese in *M. thermautotrophicus* bei 65°C (carbonathaltiges Medium).

Um die im carbonathaltigen Medium erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde die hydrogenotrophe Methanogenese durch *Methanothermobacter thermautotrophicus* im gleichen

Medium beobachtet. Der Fermentationsprozess von CO<sub>2</sub> und Wasserstoff zu Methan erfolgte auch hier stöchiometrisch (Abb. 5.6). Abweichend zum vorherigen Versuch setzte *M. thermautotrophicus* nicht den gesamten vorgelegten Wasserstoff um, obwohl dieser auch hier wieder den limitierenden Faktor darstellte. Dieses wirkte sich allerdings nicht auf die Endkonzentration des gebildeten Methans aus, welche ähnlich wie im vorherigen Versuch ausfiel. Durch den geringeren Substratverbrauch fiel aber die Änderung in der Kohlenstoffisotopensignatur des Produktes deutlich geringer aus. Ein Verbrauch von leichtem <sup>12</sup>C-CO<sub>2</sub> konnte hingegen im Substrat wie gewohnt beobachtet werden (Abb. 5.6).

Dies erkennt man auch an dem mit  $\epsilon_{\text{CO}_2} = -38,4\text{‰}$  im Erwartungsbereich liegenden Fraktionierungskoeffizienten für die Berechnung aus den Substratdaten. Aufgrund der geringen Änderung der Kohlenstoffisotopensignatur des Methans ist allerdings der aus den Produktdaten erhaltene Fraktionierungskoeffizient sehr klein und besitzt keine Aussagekraft (Abb. 5.7).

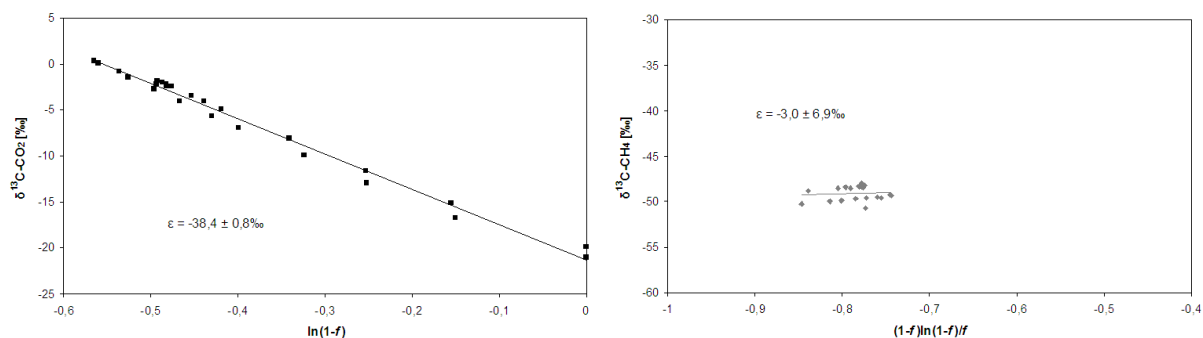


Abbildung 5.7: Mariotti-Plots für CO<sub>2</sub> und Methan für *M. thermautotrophicus* bei 65°C (carbonathaltiges Medium). Die Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden durch lineare Regression bestimmt (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

### 5.1.2 Isotopenfraktionierung in methylotrophen methanogenen Archaeen

Um die Fraktionierungskoeffizienten in Abhängigkeit des Substrats vergleichen zu können, wurden in der Folge drei methylotrophe methanogene Archaeen untersucht. Auch wenn die Zeit für Wachstum und vollständigen Verbrauch von Methanol bei den untersuchten Kulturen unterschiedlich war, verhielten sich diese während des Fermentationsprozesses ansonsten weitestgehend gleich. Das im Medium vorgelegte Methanol wurde in allen Fällen vollständig durch die Produktion von Methan und CO<sub>2</sub> verbraucht. Die erwartete Stöchiometrie (Schema 3.2) wurde in allen drei Stämmen beobachtet (Abb. 5.8, Tab. 5.2). Wobei die Abbildungen wiederum nur das CO<sub>2</sub> zeigen, welches im Gasraum des Kulturgefäßes gemessen wurde. Die Gesamtkonzentration des anorganischen Kohlenstoffs fiel durch das ins Medium zugegebene Natriumcarbonat bzw. Natriumhydrogencarbonat in allen Fällen höher aus (*M. acetivorans*: 3,0 mmol; *M. barkeri*: 1,1 mmol; *M. zinderi*: 3,6 mmol).

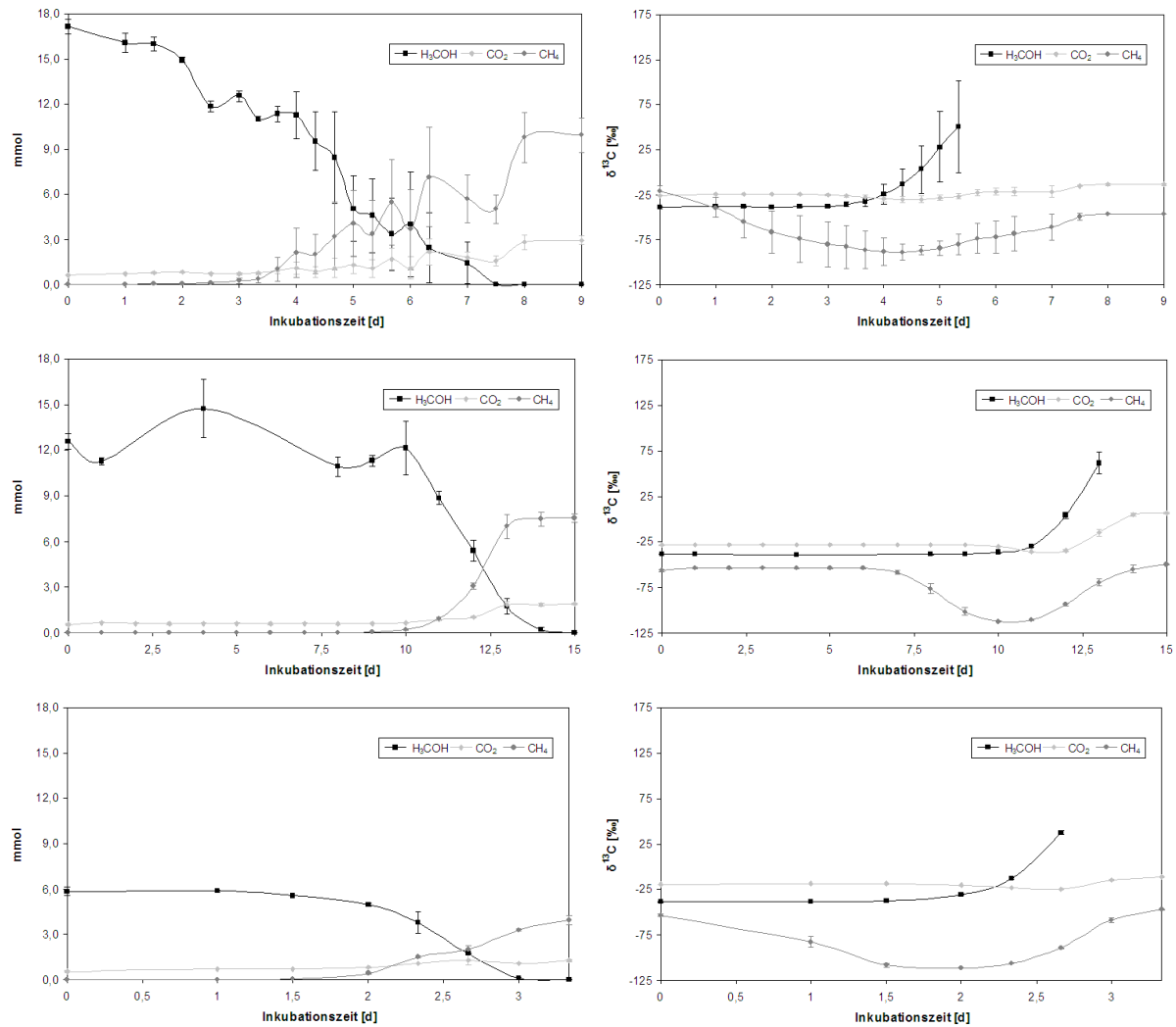


Abbildung 5.8: Konzentrationen (links) und Kohlenstoffisotopensignaturen (rechts) der Substrate und Produkte während der methylo trophen Methanogenese in *M. acetivorans* (oben), *M. barkeri* (mitte), *M. zinderi* (unten) bei 37°C.

Der Verbrauch von „leichtem“  $^{12}\text{C}$ -Methanol war ebenso wie in den vorherigen Versuchen der Verbrauch von „leichtem“  $^{12}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  bevorzugt. Dies führte zu einer Anreicherung des schwereren Isotops  $^{13}\text{C}$  im restlichen Methanol, was wiederum mit fortschreitender Reaktionsdauer zu einer Steigerung der Produktion von  $^{13}\text{C}$ - $\text{CH}_4$  führte. Der anfänglich hohe  $^{13}\text{C}$ -Wert im Methan stammte entweder aus dem Transfer von gelöstem Methan bei der Animpfung der Kulturen oder aus der Produktion von Methan aus intrazellulär gespeichertem Kohlenstoff. Die Produktion von Methan wurde zu Beginn der Reaktion durch die Produktion von „leichtem“  $^{12}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  begleitet, welche dann aber mit fortschreitender Reaktion durch die Zunahme an  $^{13}\text{C}$ -Methanol im Medium zunehmend durch die Produktion von „schwererem“  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  ersetzt wurde (Abb. 5.8). Allerdings wurde die Kohlenstoffisotopensignatur von  $\text{CO}_2$  nicht zur Bestimmung eines Fraktionierungskoeffizienten verwendet, da aufgrund des hohen Hintergrundes an Hydrogencarbonaten die Kohlenstoffisotopie des gebildeten  $\text{CO}_2$  nicht explizit gemessen werden konnte. Bei einem Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen der

Substrate und Produkte der drei methanogenen Kulturen zeigte sich, dass eine gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Stämmen gegeben ist (Abb. 5.9).

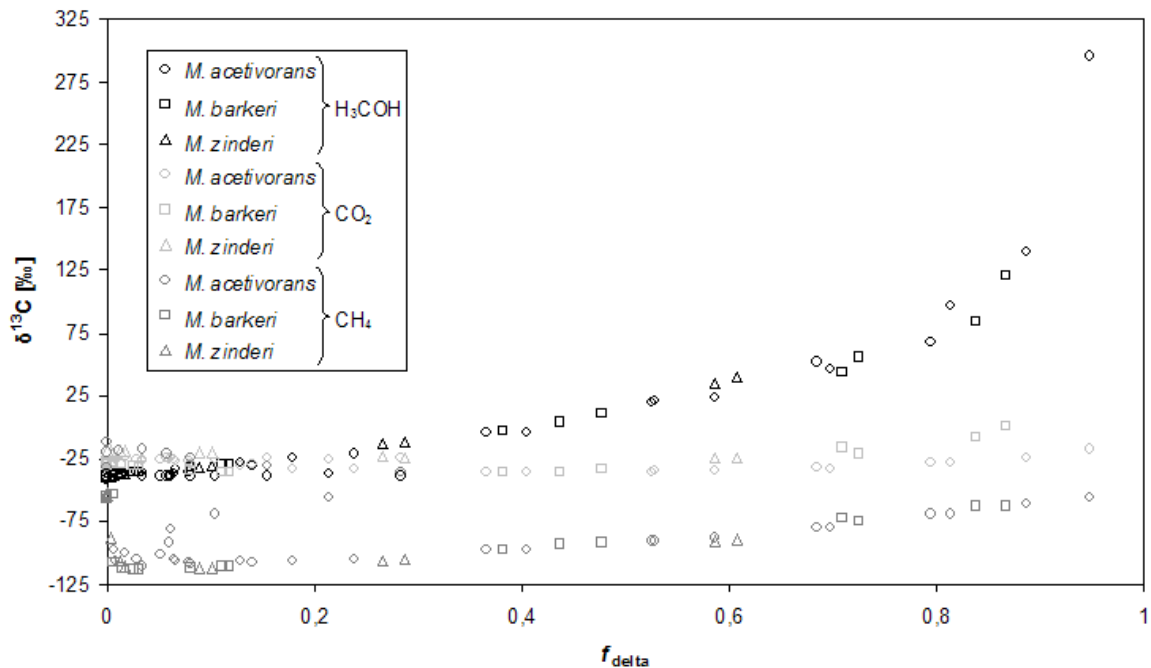


Abbildung 5.9: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte der drei untersuchten, methylotrophen methanogenen Archaeen über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Für die lineare Regression in den Mariotti-Plots für  $\text{CO}_2$  und Methan wurden hier ausschließlich Werte aus der Wachstumsphase mit der höchsten methanogenen Aktivität verwendet (Abb. 5.10). Für alle drei Stämme wurden hier ähnliche Fraktionierungskoeffizienten erhalten (Tab. 5.2).

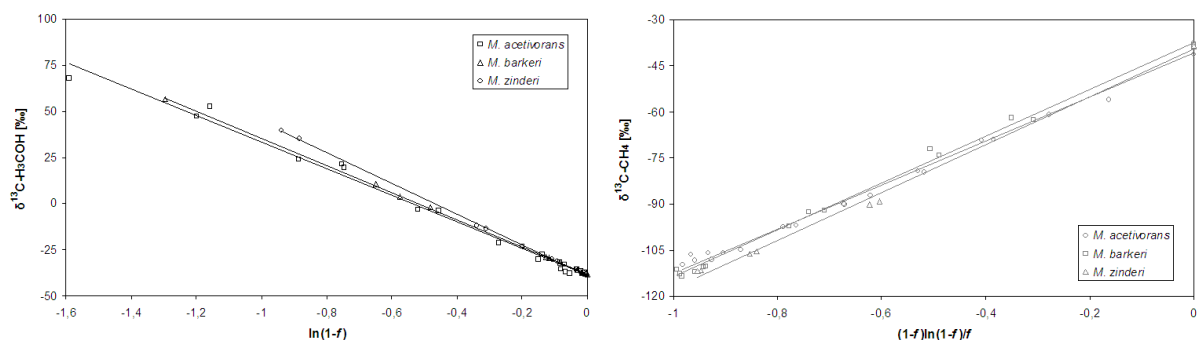


Abbildung 5.10: Mariotti-Plots für Methanol und Methan für die drei untersuchten, methylotrophen methanogenen Archaeen bei 37°C. Die Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden durch lineare Regression bestimmt (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Da allerdings das Verhältnis der Kohlenstoffisotopen für geringe Methanolkonzentrationen nicht gemessen werden konnte (Nachweisgrenze:  $\sim 2,5$  mM, 125  $\mu\text{mol}$ ), konnte nicht die gesamte Reaktion betrachtet werden. Unter Annahme einer vollständigen Umwandlung von

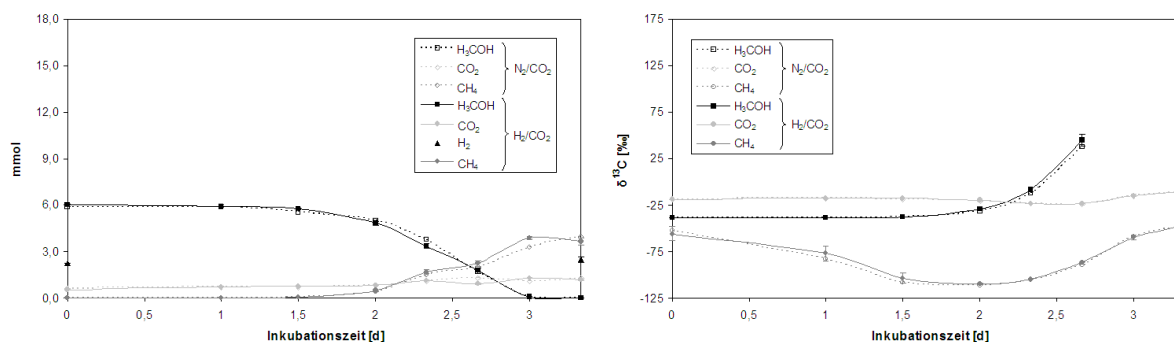
Methanol zu  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$  wurde die Regressionsgerade im Falle der Methandaten durch  $\delta_{\text{CH}_3\text{OH}}$  zum Reaktionsbeginn ( $t_0$ ) gelegt. Die anfänglichen Werte der Kohlenstoffisotopensignaturen des Methans, die durch die Inokulation verändert worden waren, wurden für die Regressionsanalyse nicht berücksichtigt.

*Tabelle 5.2:* Zusammenstellung der zu den untersuchten, methylotrophen methanogenen Archaeen bei 37°C erhaltenen Daten.

	Kohlenstoffausbeute (%)	$\epsilon_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
<i>M. acetivorans</i>	$77,32 \pm 6,7$	$-72,0 \pm 1,5$	$-71,6 \pm 1,2$
<i>M. barkeri</i>	$80,07 \pm 1,0$	$-73,5 \pm 0,3$	$-76,1 \pm 1,1$
<i>M. zinderi</i>	$89,69 \pm 2,6$	$-83,4 \pm 0,5$	$-77,9 \pm 1,8$

### 5.1.2.1 Einfluss von Wasserstoff auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung in *Methanobus zinderi*

*Methanobus zinderi* produziert laut Literatur weder aus Acetat noch aus  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , allerdings aus Methanol sowie Methylaminen Methan (Doerfert *et al.*, 2009). Allerdings war nicht beschrieben, ob in diesem Organismus die für *Methanosarcina barkeri* beschriebene Methanbildung unter Konsumption von Wasserstoff (Welander und Metcalf, 2005) stattfinden kann. Deshalb wurde in einem Nebenexperiment überprüft, ob *M. zinderi* ebenfalls dazu fähig ist, Methan durch die direkte Verwertung von Wasserstoff zu produzieren.



*Abbildung 5.11:* Konzentrationen (links) und Kohlenstoffisotopensignaturen (rechts) der Substrate und Produkte während der methylophen Methanogenese in *M. zinderi* bei 37°C in Anwesenheit und Abwesenheit von Wasserstoff.

Die unter  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen des Versuchs unter  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  verglichen. *M. zinderi* setzte unter beiden Gasen während des Fermentationsprozesses das konsumierte Methanol in gleicher Weise zu Methan und  $\text{CO}_2$  um (Abb. 5.11). Sowohl ein Verbrauch von Wasserstoff als auch ein Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen war nicht zu erkennen. Ebenfalls waren die Änderungen der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte innerhalb der beiden durchgeführten Versuche identisch (Abb. 5.11).



Die für Substrat und Produkt in den Mariotti-Plots durch lineare Regression erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten waren aufgrund des gleichen Verlaufs der Kohlenstoffisotopensignaturen ebenfalls fast identisch (Abb. 5.12).

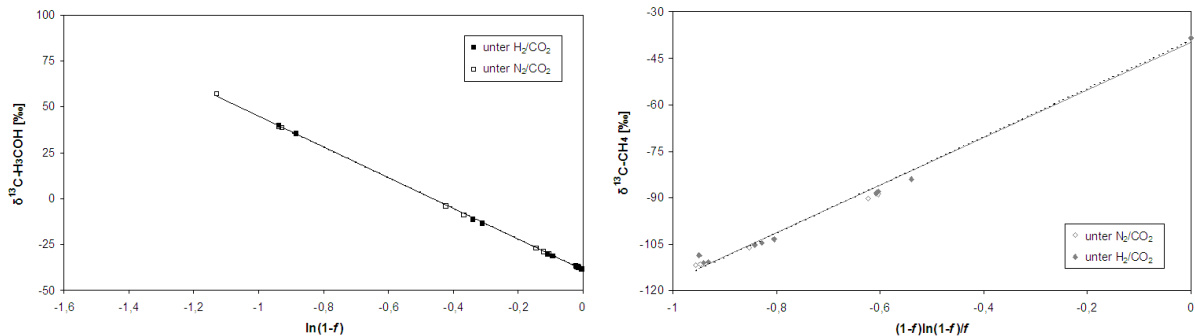


Abbildung 5.12: Vergleich der Mariotti-Plots für Methanol und Methan für *M. zinderi* bei 37°C in Anwesenheit und Abwesenheit von Wasserstoff. Die Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden durch lineare Regression bestimmt (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Durch den Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ist wie schon aus dem Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen deutlich zu erkennen, dass das Wachstum in keiner Weise durch den zusätzlichen Wasserstoff beeinflusst wird (Tab. 5.3). Dies bestätigt die Vermutung, welche die gaschromatographischen Messung, die keinen Verbrauch von Wasserstoff zeigte, nahe legte.

Tabelle 5.3: Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. zinderi* bei 37°C in Anwesenheit und Abwesenheit von Wasserstoff.

	$\epsilon_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
<i>M. zinderi</i> unter $\text{N}_2/\text{CO}_2$	$-83,4 \pm 0,5$	$-77,9 \pm 1,8$
<i>M. zinderi</i> unter $\text{H}_2/\text{CO}_2$	$-84,1 \pm 0,5$	$-77,6 \pm 1,7$

Um allerdings aus diesen Ergebnissen zu bestätigen, dass Wasserstoff gar keinen Einfluss auf die Kohlenstoffisotopensignaturen innerhalb der methyilotrophen Methanogenese nimmt, müsste überprüft werden, ob und wie die Kohlenstoffisotopensignatur von Substraten und Produkten in *M. barkeri* durch die Anwesenheit von Wasserstoff verändert wird.

### 5.1.3 Isotopenfraktionierung in homoacetogenen Bakterien

Um besser zu verstehen inwiefern der Fraktionierungskoeffizient vom verwendeten Substrat abhängt, wurde als Vergleich zu den hydrogenotrophen Methanogenen ein ebenfalls thermophiles, homoacetogenes Bakterium untersucht. *Thermoanaerobacter kivui* setzte während des Fermentationsprozesses die konsumierten Substrate nach bekannter Stöchiometrie (Schema 5.1) in Acetat um (Abb. 5.13). Wiederum ist hier nur der Anteil des  $\text{CO}_2$  abgebildet, welcher in der Gasphase des Kulturgefäßes gemessen wurde. Aufgrund

fehlenden zusätzlichen Hydrogencarbonats im Medium wurde lediglich die Hälfte des vorgelegten Wasserstoffs genutzt, da durch die Begasung das Verhältnis der beiden Substrate zueinander 4:1 statt 2:1 betrug. Allerdings wurden trotz vollständigen Verbrauchs von CO<sub>2</sub> (0,6 mmol) nur 58% der theoretischen Ausbeute an Acetat (0,17 mmol) erhalten.



Schema 5.1: Bilanzgleichung des homoacetogenen Stoffwechselweges (Schink, 1997).

Da die geringe Menge an anfänglich gebildeten Formiat (nach einem Tag: 0,015 mmol) vollständig verbraucht wurde, war anzunehmen, dass das verbrauchte CO<sub>2</sub>, welches nicht der Acetatbildung beitrug, in Biomasse umgesetzt wurde. Da aber zusätzlich die höchste Konzentration an Acetat nach halbem Verbrauch der Substrate gemessen wurde, besteht eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der geringen Ausbeute darin, dass eine Rückreaktion innerhalb des Bakteriums stattfindet. Zur Klärung dieser Problematik werden gegenwärtig Versuche mit gelabelten Acetat durchgeführt (Blaser, persönliches Gespräch am 28.06.2012).

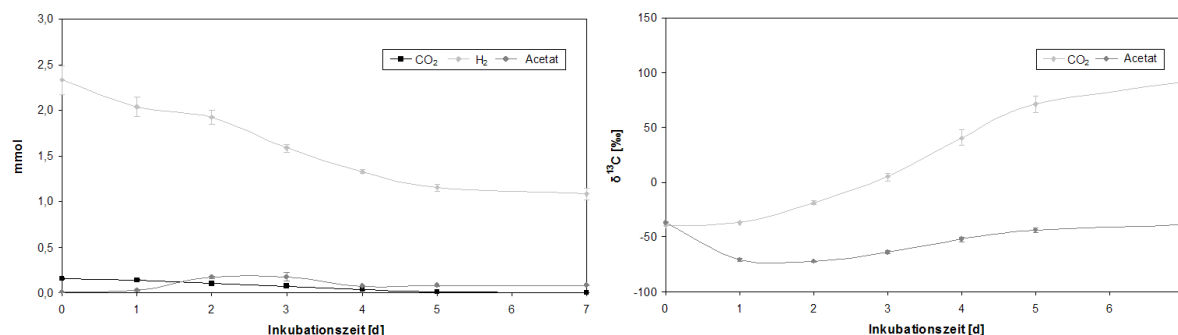


Abbildung 5.13: Konzentrationen (links) und Kohlenstoffisotopensignaturen (rechts) der Substrate und Produkte während der Homoacetogenese in *T. kivui* bei 60°C.

Durch den bevorzugten Verbrauch von „leichtem“ <sup>12</sup>C-CO<sub>2</sub>, konnte wie in den methanogenen Kulturen die erwartete Anreicherung von <sup>13</sup>C im verbleibenden CO<sub>2</sub> beobachtet werden, was dann mit fortschreitender Reaktionsdauer zu einer Steigerung der Produktion von <sup>13</sup>C-Acetat führte. Der anfänglich hohe <sup>13</sup>C-Wert im Produkt stammte wiederum entweder aus dem Transfer von Acetat bei der Animpfung der Kulturen oder aus der Produktion von Acetat aus intrazellulär gespeichertem Kohlenstoff (Abb. 5.13).

Tabelle 5.4: Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten (ε) von *M. marburgensis* bei 65°C (carbonatfreies Medium) und *T. kivui* bei 60°C.

	ε <sub>Substrat</sub> (‰)	ε <sub>Produkt</sub> (‰)
<i>M. marburgensis</i>	-33,9 ± 0,6	-30,9 ± 0,9
<i>T. kivui</i>	-40,6 ± 0,5	-44,3 ± 0,5

Ein Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten mit denen der hydrogenotrophen Methanogenese zeigte im Mittel einen Unterschied von 10‰. Im Einzelnen bedeutete dies für die Fraktionierungskoeffizienten aus den Substratdaten ein Unterschied von 6,7‰ und für die aus den Produktdaten von 13,4‰ (Tab. 5.4).

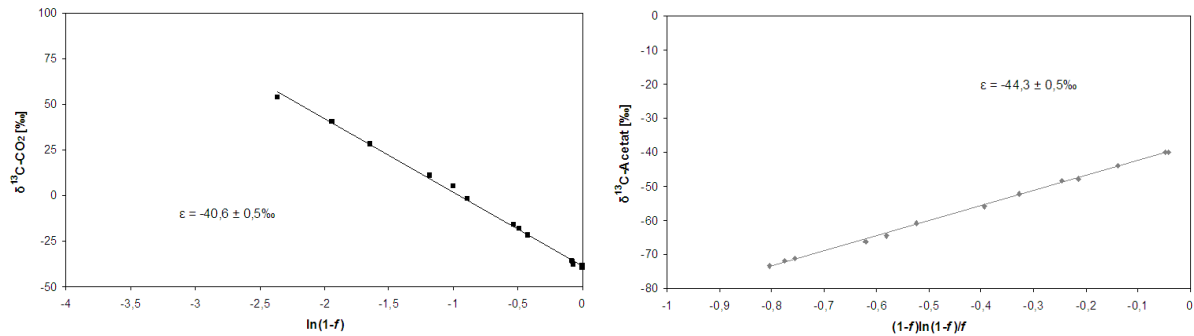


Abbildung 5.14: Mariotti-Plots für CO<sub>2</sub> und Acetat für *T. kivui* bei 60°C. Die Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden durch lineare Regression bestimmt (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Bei einem Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte innerhalb der beiden thermophilen, hydrogenotrophen Kulturen konnte ebenfalls für das Substrat eine sehr gute Übereinstimmung beobachtet werden. Das anfänglich gebildete Produkt war bei der Homoacetogenese allerdings etwas „leichter“, was auf die Bildung geringer Mengen „schweren“ Formiats zu Beginn der Reaktion zurückzuführen sein könnte. (Abb. 5.15).

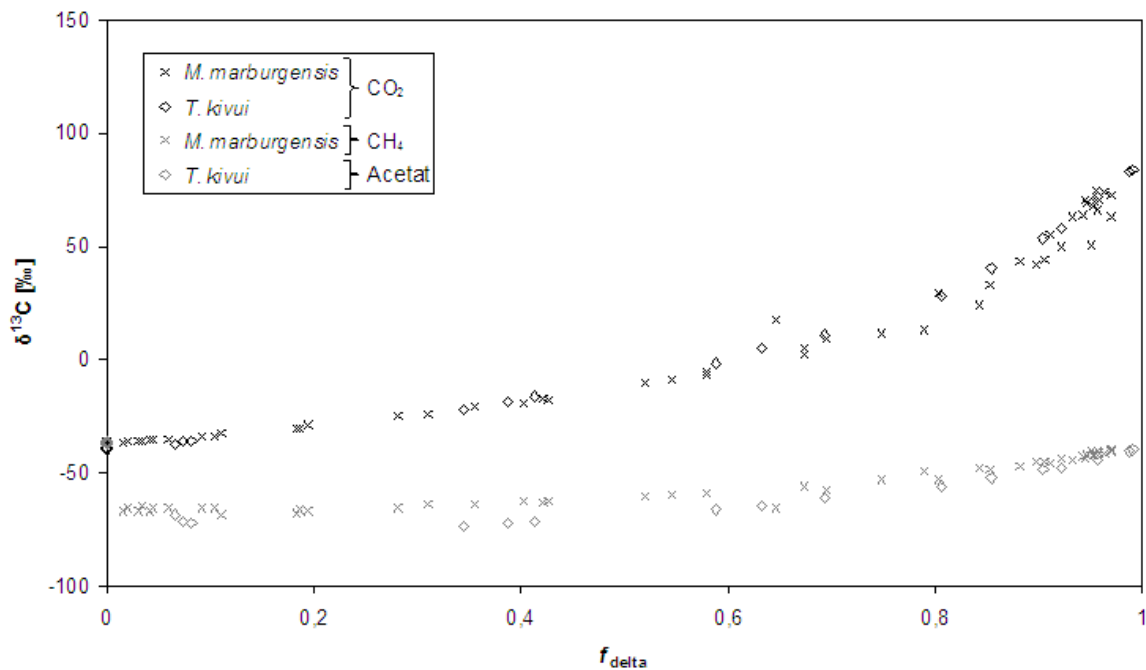


Abbildung 5.15: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte von *M. marburgensis* bei 65°C (carbonatfreies Medium) und *T. kivui* bei 60°C über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

## 5.2 Temperaturabhängigkeit der Kohlenstoffisotopenfraktionierung

Nachdem die Fraktionierungskoeffizienten bei optimalen Wachstumsbedingungen bestimmt worden waren, wurden Versuche durchgeführt, welche zeigen sollten, ob diese von der Wachstumstemperatur und der davon abhängigen Wachstumsgeschwindigkeit beeinflusst werden. Hierfür wurden Konzentrationen und Isotopensignaturen von Substraten und Produkten der gleichen Organismen während der Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen.

### 5.2.1 Einfluss der Temperatur auf hydrogenotrophe methanogene Archaeen

#### 5.2.1.1 Temperaturänderung im carbonatfreien Medium

Aufgrund der durch Schönheit *et al.* (1980) publizierten Wachstumskurve für *Methanothermobacter marburgensis* wurden Inkubationstemperaturen zwischen 37°C und 70°C gewählt. Außer in der Inkubation bei 70°C, wo keine Bildung von Methan und Biomasse beobachtet werden konnte, fand die erwartete Umsetzung von CO<sub>2</sub> und Wasserstoff zu Methan statt.

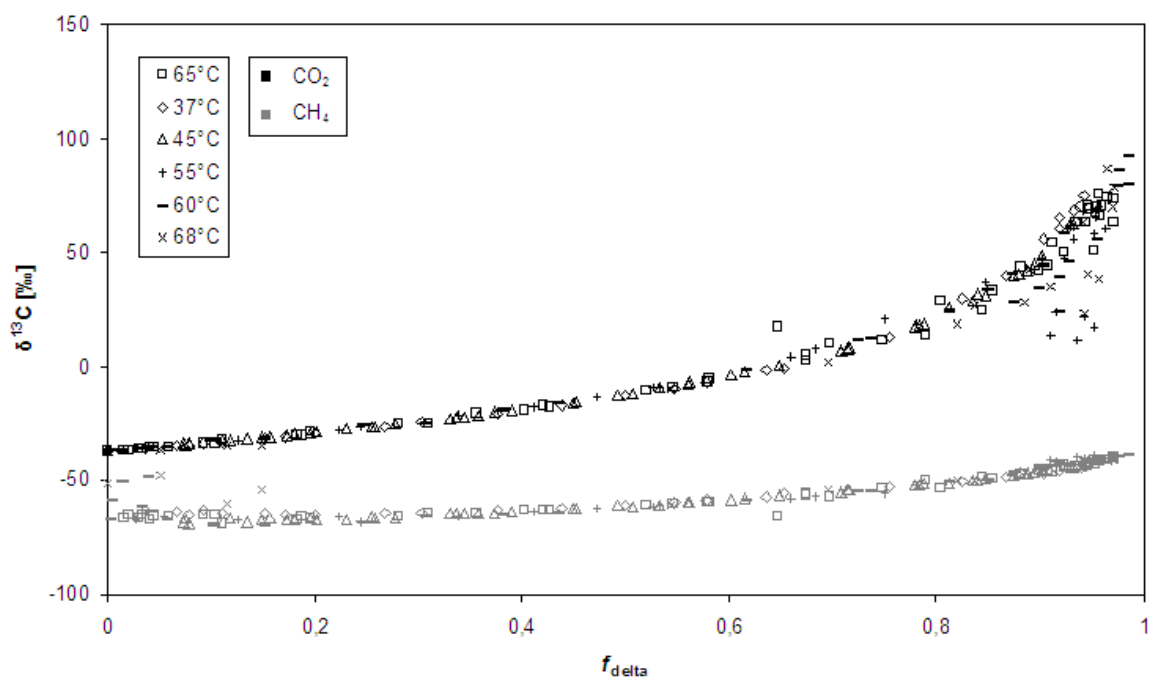


Abbildung 5.16: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte von *M. marburgensis* bei unterschiedlichen Temperaturen (carbonatfreies Medium) über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Ein Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte (Abb. 5.16) als auch ein Vergleich der durch lineare Regression in den Mariotti-Plots erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten (Tab. 5.5) zeigte keine Temperaturabhängigkeit der Kohlenstoffisotopenfraktionierung. Unabhängig von der Inkubationstemperatur lagen die

erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten zwischen -36,9‰ und -30,9‰. Auffällig war nur eine Streuung der Werte der Kohlenstoffisotopensignatur des gemessenen CO<sub>2</sub> gegen Ende der Reaktion. Diese trat ebenfalls unabhängig von der Inkubationstemperatur auf und lag an der Bildung von Maxima im Verlauf der Kohlenstoffisotopensignatur in einigen Replikaten. Ob dies allerdings einen messtechnischen Grund aufgrund ungenauer Messungen der Isotopenverhältnisse bei niedrigen Kohlenstoffdioxidkonzentrationen oder einen chemischen Grund aufgrund einer verspäteten Einstellung eines Gleichgewichts zwischen ungelöstem und gelöstem CO<sub>2</sub> hatte, konnte nicht geklärt werden. Bei der Berechnung des Fraktionierungskoeffizienten wurden diese Werte allerdings vernachlässigt.

*Tabelle 5.5:* Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. marburgensis* bei unterschiedlichen Temperaturen (carbonatfreies Medium).

Temperatur (°C)	$\epsilon_{\text{CO}_2}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
37	-36,7 ± 0,5	-32,0 ± 0,4
45	-36,9 ± 0,1	-33,7 ± 0,2
55	-35,7 ± 0,5	-31,7 ± 1,3
60	-32,5 ± 0,8	-35,5 ± 0,8
65	-33,9 ± 0,6	-30,9 ± 0,9
68	-35,7 ± 1,2	-36,0 ± 1,4

### 5.2.1.2 Temperaturänderung im carbonathaltigen Medium

Um die im carbonatfreien Medium erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten mit denen im carbonathaltigen Medium zu vergleichen, wurde der Versuch in einem nach den von Zeikus und Wolfe (1972) publizierten Wachstumsdaten leicht variierten Temperaturbereich mit *Methanothermobacter thermautotrophicus* wiederholt.

*Tabelle 5.6:* Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. thermautotrophicus* bei unterschiedlichen Temperaturen (carbonathaltiges Medium).

Temperatur (°C)	$\epsilon_{\text{CO}_2}$ (‰)
40	-36,1 ± 0,9
50	-33,7 ± 0,5
55	-34,3 ± 0,3
60	-36,4 ± 1,0
65	-38,4 ± 0,8
68	-38,3 ± 0,7

In allen untersuchten Inkubationen wurde der eingesetzte anorganische Kohlenstoff unter Verwendung des vorgelegten Wasserstoffs analog zur Inkubation bei 65°C zu lediglich 45%

verbraucht. Dies hatte wiederum zur Folge, dass der aus den gemessenen Kohlenstoffisotopenverhältnissen berechnete Substratverbrauch ( $f_{\text{delta}}$ ) in keiner Inkubation den Wert von 0,45 überschritt (Abb. 5.17).

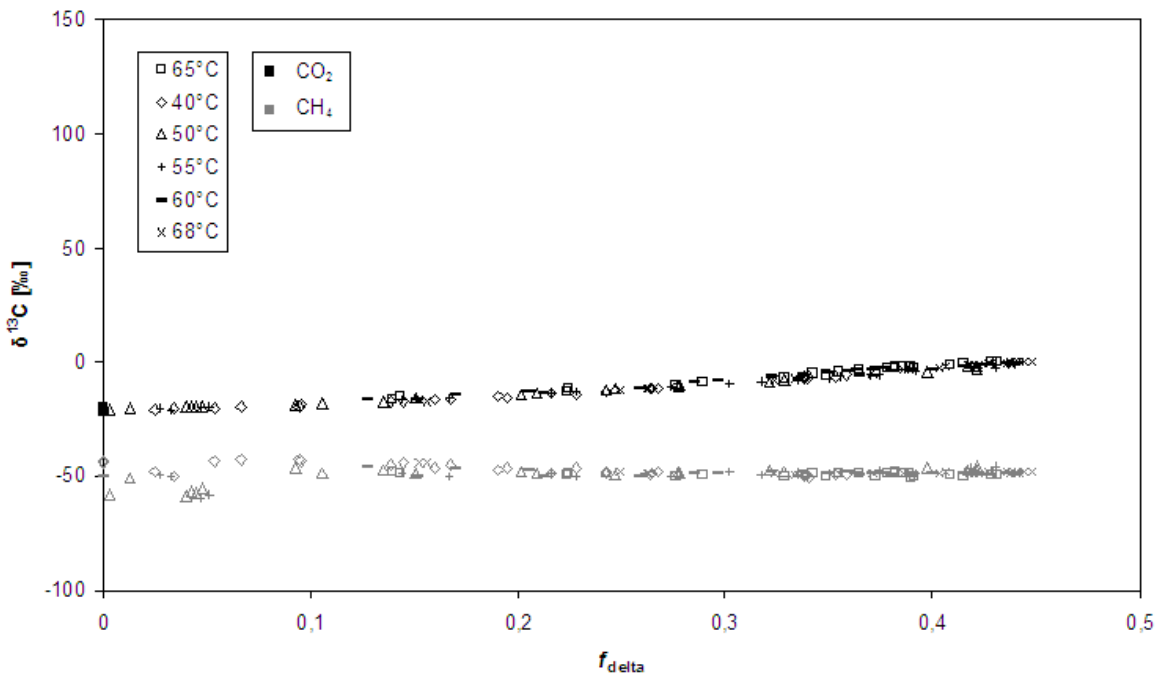


Abbildung 5.17: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte von *M. thermoautotrophicus* bei unterschiedlichen Temperaturen (carbonathaltiges Medium) über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Aufgrund des nur geringen Umsatzes von anorganischem Kohlenstoff wurde allerdings so wenig „schweres“  $^{13}\text{C}\text{-CH}_4$  gebildet, dass die Bestimmung eines vergleichbaren Fraktionierungskoeffizienten durch lineare Regression in den für die Produktdaten erstellten Mariotti-Plots nicht möglich war. Ein Vergleich der für die Substratdaten erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten (Tab. 5.6) zeigte aber genauso wie ein Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte (Abb. 5.17), dass die Temperatur auch im carbonathaltigen Medium keinen Einfluss auf die hydrogenotrophe Methanogenese nimmt.

### 5.2.2 Einfluss der Temperatur auf methylootrophe methanogene Archaeen

Ebenfalls wurden die Fraktionierungskoeffizienten der drei zuvor untersuchten, mesophilen Archaeen hinsichtlich ihrer Temperaturempfindlichkeit untersucht. Der gewählte Temperaturbereich lag hierfür zwischen 10°C und 50°C, wobei allerdings unterhalb von 25°C sowie oberhalb von 40°C für keinen der Stämme verwertbare Daten erhalten werden konnten. Die dafür verantwortlichen Gründe waren, dass entweder die erhaltenen Datenmengen zu gering ausfielen, da nach sehr langen Lag-Phasen „Sprünge“ im Verhältnis der Kohlenstoffisotopie des Methans auftraten, oder aber gar keine Methanbildung stattfand.

Im Falle von *Methanosarcina acetivorans* wurden lediglich Daten im Temperaturbereich zwischen 25°C und 37°C erhalten, da bei 40°C ebenfalls die erwähnten „Sprünge“ auftraten.

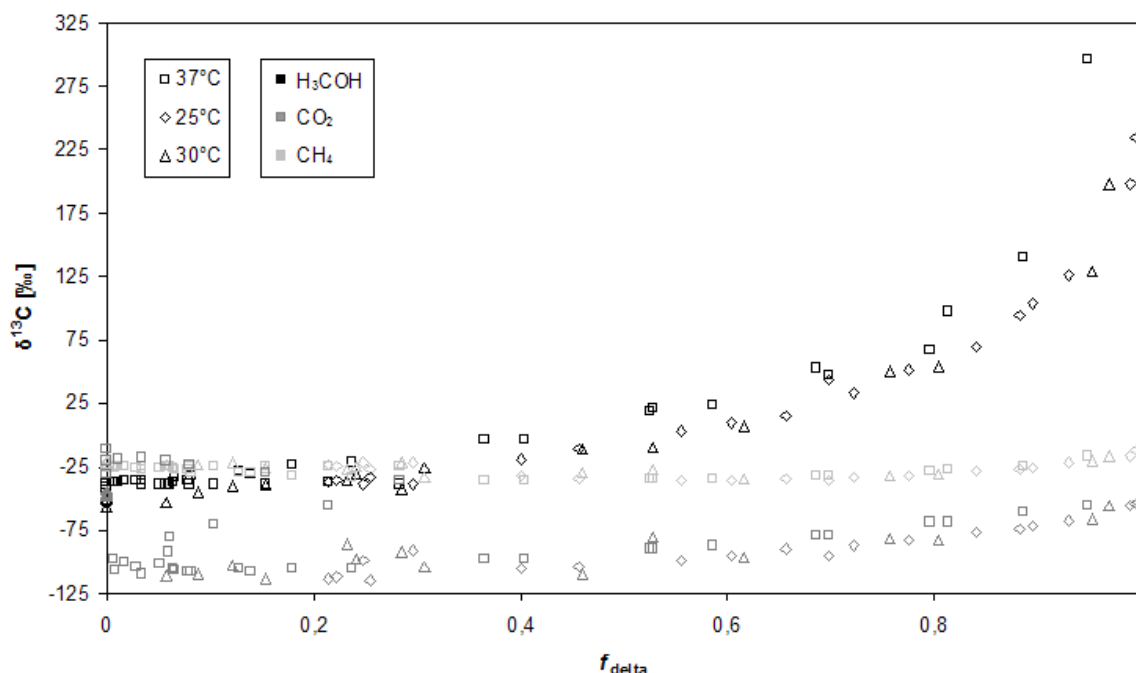


Abbildung 5.18: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte von *M. acetivorans* bei unterschiedlichen Temperaturen über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Der Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen von Substraten und Produkten zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den Inkubationen bei den verschiedenen Temperaturen (Abb. 5.18). Hierbei fällt lediglich auf, dass für die Inkubation bei 37°C gegen Ende der Reaktion ein deutlich höherer Wert für das Kohlenstoffisotopenverhältnisses des Methanols sowie des Methans gemessen wurde. Dies ist allerdings darauf zurückzuführen, dass das eingesetzte Methanol schon zu Beginn der Reaktion einen höheren Anteil an  $^{13}\text{C}$ -Methanol aufwies und somit alle im späteren Verlauf der Reaktion gemessenen Werte höher ausfielen.

Tabelle 5.7: Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. acetivorans* bei unterschiedlichen Temperaturen.

Temperatur (°C)	$\epsilon_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
25	$-68,3 \pm 1,3$	$-69,2 \pm 1,3$
30	$-72,3 \pm 1,8$	$-62,6 \pm 6,0$
37	$-72,0 \pm 1,5$	$-71,6 \pm 1,2$

Dieses hatte allerdings keinen Einfluss auf die der durch lineare Regression in den Mariotti-Plots erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten bei deren Vergleich keine direkte Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur zu erkennen war (Tab. 5.7).

Für *Methanosarcina barkeri* konnten zusätzlich auch bei 40°C verwertbare Daten erhalten werden, wodurch der auswertbare Temperaturbereich ausgedehnt werden konnte.

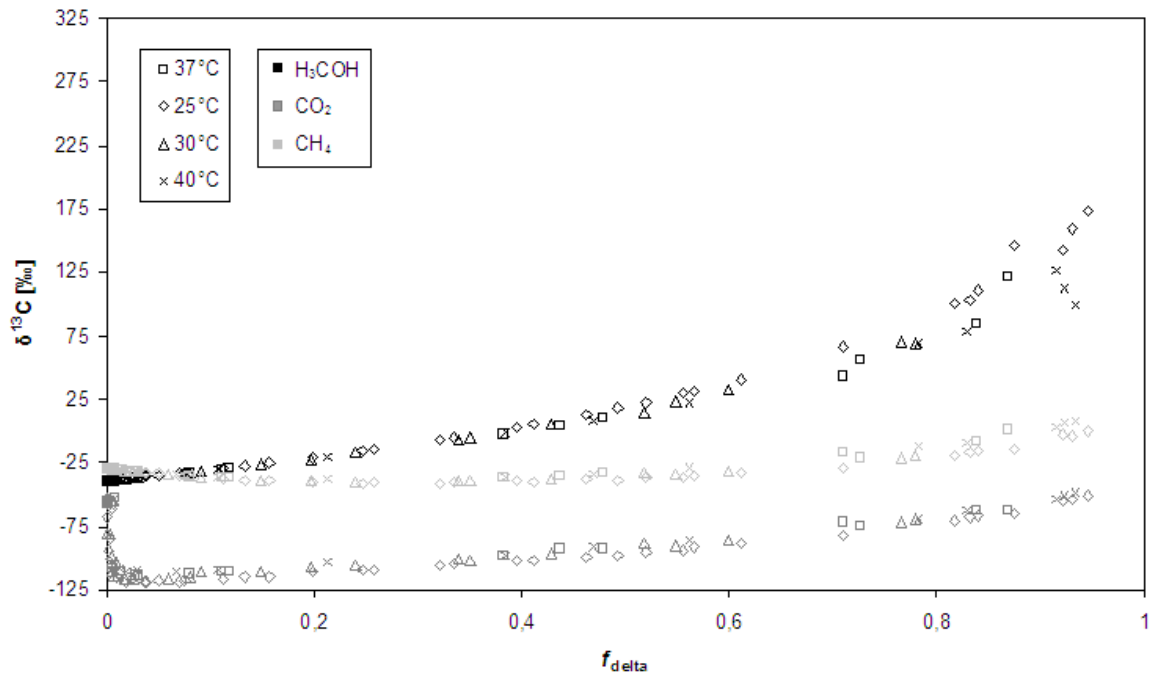


Abbildung 5.19: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte von *M. barkeri* bei unterschiedlichen Temperaturen über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Wiederum zeigte ein Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen von Substraten und Produkten keine Unterschiede zwischen den Inkubationen bei den verschiedenen Temperaturen (Abb. 5.19). Allerdings konnte bei einem Vergleich der durch lineare Regression in den Mariotti-Plots erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten beobachtet werden, dass bei 25°C eine um etwa 5‰ stärkere Fraktionierung auftrat als bei höheren Temperaturen (Tab. 5.8). Da diese Temperaturabhängigkeit aber in keinem anderen Organismus beobachtet werden konnte, fand eine zusätzliche Verifizierung dieser Daten mit höherer Auflösung bezüglich der Temperatur durch eine Inkubation in der „Temperaturorgel“ statt (siehe 5.2.2.1), welche zeigte, dass es sich dort bei den niedrigen Fraktionierungskoeffizienten um ein durch den Abstand der Messzeitpunkte hervorgerufenes Phänomen handelt.

Tabelle 5.8: Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. barkeri* bei unterschiedlichen Temperaturen.

Temperatur (°C)	$\epsilon_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
25	$-78,1 \pm 1,0$	$-82,6 \pm 0,5$
30	$-73,6 \pm 0,8$	$-77,9 \pm 1,0$
37	$-73,5 \pm 0,3$	$-76,1 \pm 1,1$
40	$-67,0 \pm 1,0$	$-75,0 \pm 1,0$



Da in der Inkubation von *Methanolobus zinderi* bei 25°C auch wieder die erwähnten „Sprünge“ auftraten, konnten hier wie bei *M. acetivorans* lediglich für 3 verschiedene Temperaturen verwertbare Daten gesammelt werden.

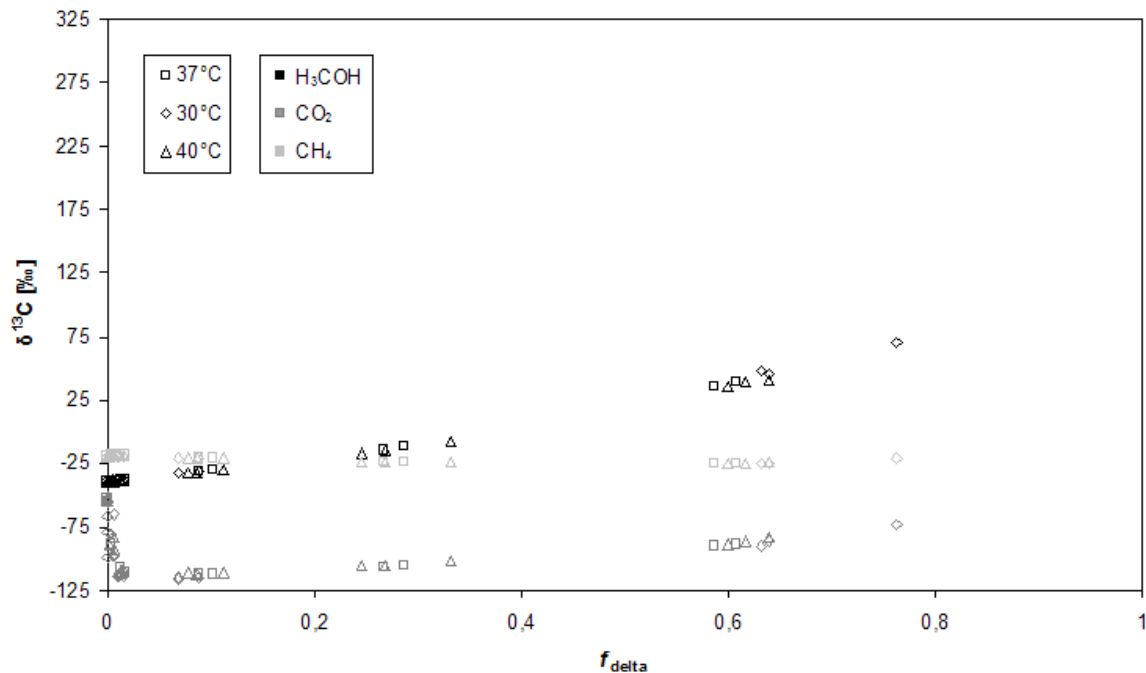


Abbildung 5.20: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte von *M. zinderi* bei unterschiedlichen Temperaturen über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Ein Vergleich der für durch lineare Regression in den Mariotti-Plots erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten (Tab. 5.9) zeigte aber genauso wie ein Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte (Abb. 5.20) ebenfalls keine Abhängigkeiten zur Inkubationstemperatur.

Tabelle 5.9: Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. zinderi* bei unterschiedlichen Temperaturen.

Temperatur (°C)	$\epsilon_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
30	$-79,7 \pm 2,5$	$-79,8 \pm 1,7$
37	$-83,4 \pm 0,5$	$-77,9 \pm 1,8$
40	$-79,4 \pm 0,8$	$-76,5 \pm 1,0$

Die für alle untersuchten Organismen durch lineare Regression in den Mariotti-Plots erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten lagen zwischen  $-83,4\text{‰}$  und  $-62,6\text{‰}$  und unterschieden sich somit unabhängig von der Temperatur nur geringfügig. Auch ein zusätzlicher Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte aller untersuchten, methylo trophen Methanogenen untereinander zeigte für die einzelnen

Temperaturen keine Besonderheiten (Abb. 5.21), wodurch ein Einfluss der Temperatur auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung während der methylo trophen Methanogenese ausgeschlossen werden kann.

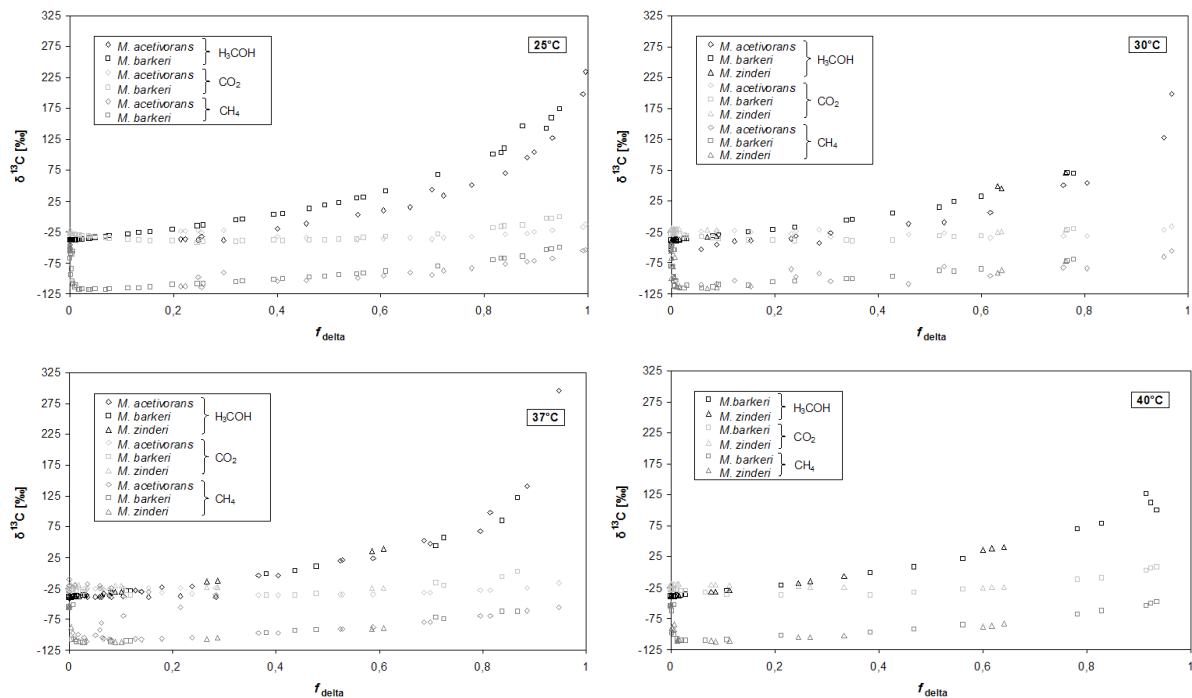


Abbildung 5.21: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte der drei untersuchten, methylo trophen methanogenen Archaeen bei unterschiedlichen Temperaturen über den Verbrauch der Reaktanten  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

### 5.2.2.1 Inkubation von *Methanosarcina barkeri* in der „Temperaturorgel“

Um die zuvor für *Methanosarcina barkeri* erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und die Temperaturen am Rand des Wachstumsfensters besser untersuchen zu können, wurde der vorhergehende Versuch in der „Temperaturorgel“ (siehe auch 4.4.7.2) wiederholt. Da aber aufgrund der geringen Volumina (4 ml) nur eine kleine Datenmenge für jedes Replikat erhalten werden konnte, war die Erstellung von Mariotti-Plots nicht möglich. Um einen Vergleich der gewonnen Daten durchführen zu können, wurde hier auf die Bestimmung der so genannten „Doppel-Deltas“ zurückgegriffen. Hierzu wurde der erste gemessene Wert der Kohlenstoffisotopensignatur des Methanols vom niedrigsten gemessenen Wert der Kohlenstoffisotopie des Methans abgezogen. Die durch diese Methode erhaltenen Werte sollten mit denen, welche als Steigung der linearen Regression in Mariotti-Plots erhalten wurden, weitgehend identisch sein, da sich zum Zeitpunkt der ersten Methanbildung das Kohlenstoffisotopenverhältnis des akkumulierten und des aktuell gebildeten Produktes nicht unterscheiden (siehe auch Abb. 3.4). Somit galt zu diesem Zeitpunkt aufgrund gleicher Bedingungen die gleiche Berechnungsgrundlage wie im offenen System.

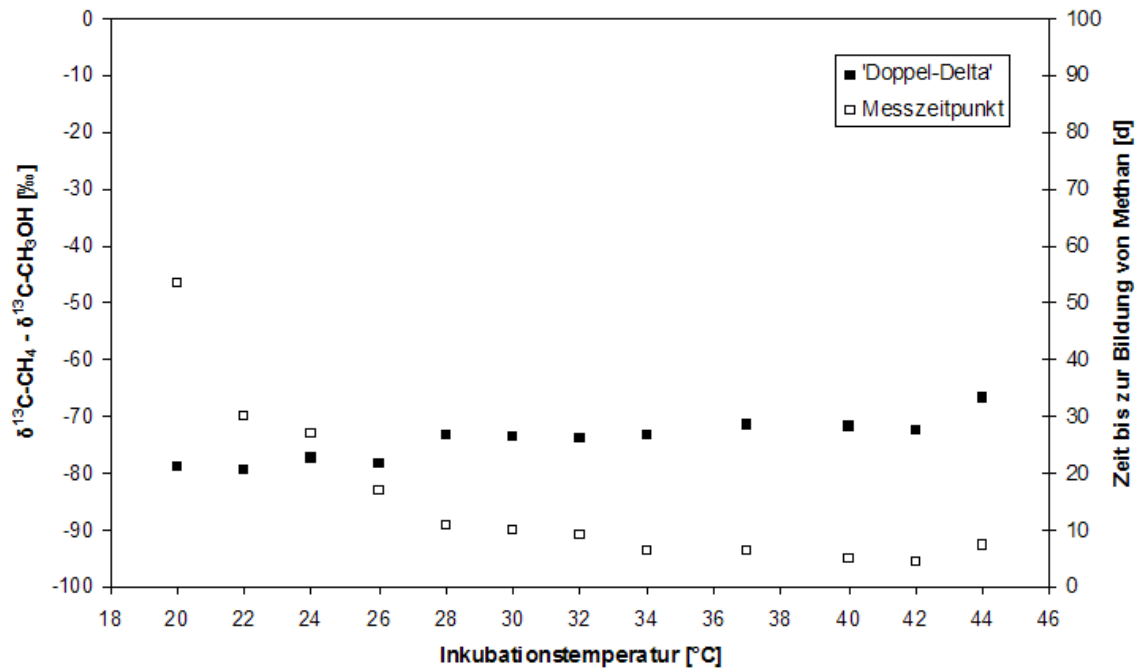


Abbildung 5.22: Grafische Auftragung der für *M. barkeri* in der „Temperaturorgel“ durch „Doppel-Delta“-Bestimmung erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) und der bis zum Einsetzen der Methanbildung vergangenen Zeit in Abhängigkeit der Temperatur.

Der auf diese Weise bei der optimalen Wachstumstemperatur (37°C) erhaltene Fraktionierungskoeffizient lag bei -71,4‰ und unterschied sich somit nur unwesentlich von dem durch lineare Regression in den Mariotti-Plots erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten (Tab. 5.2). Die über das ganze Temperaturspektrum erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten lagen zwischen -79,4‰ und -66,7‰ (Abb. 5.22). Somit lagen diese im durch den vorherigen Versuch zu erwartenden Bereich und zeigten ebenfalls wieder eine geringe Temperaturabhängigkeit. Die berechneten Fraktionierungskoeffizienten zwischen 20°C und 26°C lagen um etwa 5‰ niedriger als die bei anderen Temperaturen. Nach genauerer Betrachtung der Messdaten war allerdings davon auszugehen, dass es sich hierbei wie im vorherigen Versuch lediglich um ein messtechnisch hervorgerufenen Phänomen handelt. Da die Messungen einmal pro Tag durchgeführt wurden, ist bei den langsamer wachsenden Kulturen unterhalb von 28°C davon auszugehen, dass die Kohlenstoffisotopie des zu Beginn der Methanbildung gebildeten Methans genauer gemessen werden konnte. Im Gegensatz hierzu wurde bei den Kulturen, die innerhalb der ersten zehn Tage Methan gebildet hatten, schon die Kohlenstoffisotopie eines akkumulierten Produkts mit höherer Kohlenstoffisotopie gemessen.

### 5.2.3 Einfluss der Temperatur auf homoacetogene Bakterien

Um zu beobachten ob die Temperatur Einfluss auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung während der Homoacetogenese nimmt, wurde zusätzlich das schon zuvor für die Homoacetogenen als Stellvertreter verwendete Bakterium *Thermoanaerobacter kivui*

untersucht. Hierfür wurden Proben des thermophilen Bakteriums bei Temperaturen zwischen 37°C und 65°C inkubiert. Zwischen 45°C und 65°C wurde dabei aus den konsumierten Substraten Acetat gebildet. In der Inkubation bei 37°C konnte hingegen weder die Bildung von Acetat noch von Biomasse beobachtet werden.

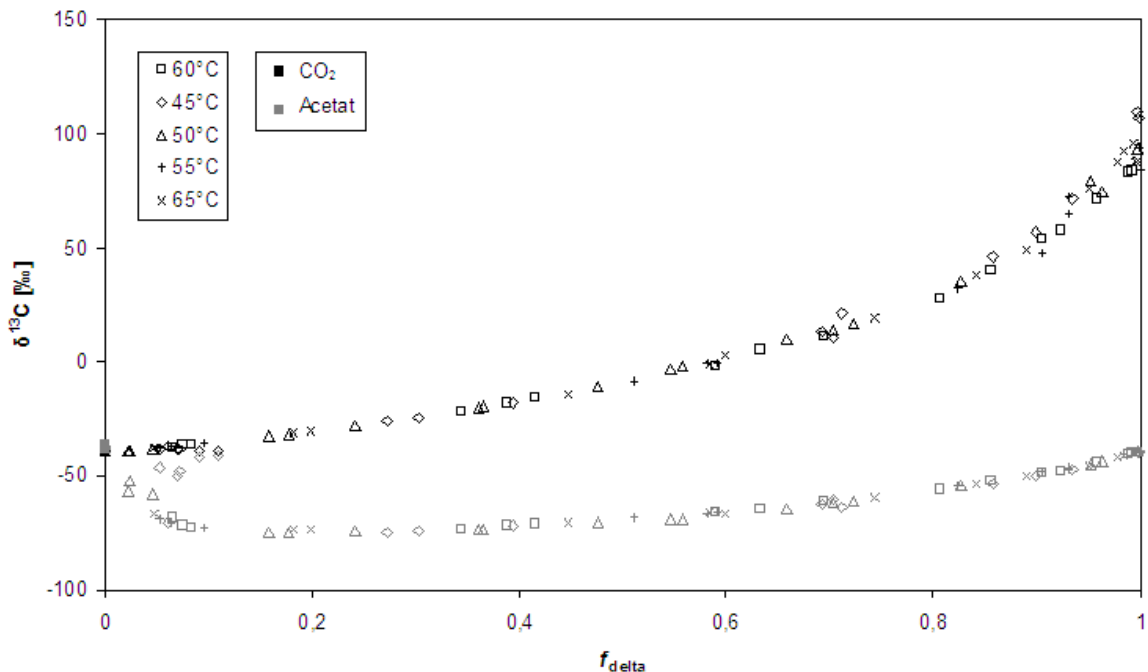


Abbildung 5.23: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte von *T. kivui* bei unterschiedlichen Temperaturen über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Wie schon in allen vorangegangenen Versuchen konnte auch hier sowohl beim Vergleich der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte (Abb. 5.23) wie auch beim Vergleich der durch lineare Regression in den Mariotti-Plots erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten (Tab. 5.10) kein Einfluss der Temperatur beobachtet werden, wodurch auch für die Homoacetogenese eine Temperaturabhängigkeit ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 5.10: Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *T. kivui* bei unterschiedlichen Temperaturen.

Temperatur (°C)	$\epsilon_{\text{CO}_2}$ (‰)	$\epsilon_{\text{Acetat}}$ (‰)
45	$-42,8 \pm 0,8$	$-42,5 \pm 1,2$
50	$-40,6 \pm 0,8$	$-44,9 \pm 0,8$
55	$-40,5 \pm 0,6$	$-44,8 \pm 0,8$
60	$-40,6 \pm 0,5$	$-44,3 \pm 0,5$
65	$-39,6 \pm 0,8$	$-44,5 \pm 0,6$

### 5.3 pH-Abhängigkeit der Kohlenstoffisotopenfraktionierung

Neben der Temperatur stellt der pH-Wert einen der wichtigsten äußeren Einflüsse auf mikrobiologische Prozesse dar. Um abzuschätzen wie groß der Einfluss des pH-Wertes auf die Isotopenfraktionierung von stabilem  $^{13}\text{C}$  ist, wurde der pH-Wert im Medium einiger Reinkulturen von *Methanothermobacter marburgensis* durch Zugabe von Salzsäure sowie Natronlauge verändert und dann wie gewohnt die Konzentrationen und die Isotopensignaturen von Substraten und Produkten während der Inkubation gemessen.

#### 5.3.1 Änderung des pH-Wertes im hydrogenotrophen methanogenen System

Während des Fermentationsprozesses setzte *M. marburgensis* unter fast allen eingestellten pH-Werten das konsumierte  $\text{CO}_2$  und den konsumierten Wasserstoff wie bereits gezeigt in Methan um. Lediglich bei einem pH-Wert von 5,0 konnte weder die Produktion von Methan noch von Biomasse beobachtet werden, was aber aufgrund der von Schönheit *et al.* (1980) publizierten Wachstumskurve erwartet werden konnte.

Dagegen stand in keiner Übereinstimmung mit den bereits publizierten Daten, dass in den übrigen Fällen die Gesamtmenge des produzierten Methans mit steigendem pH-Wert sank (Tab. 5.11). Dies kann sehr wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass sich aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte das als Gas zugesetzte  $\text{CO}_2$  in unterschiedlichen Mengen im Medium löst. Hierbei gilt: Umso höher der pH-Wert des Mediums, desto mehr  $\text{CO}_2$  geht ins Medium über (Abb. 5.24).

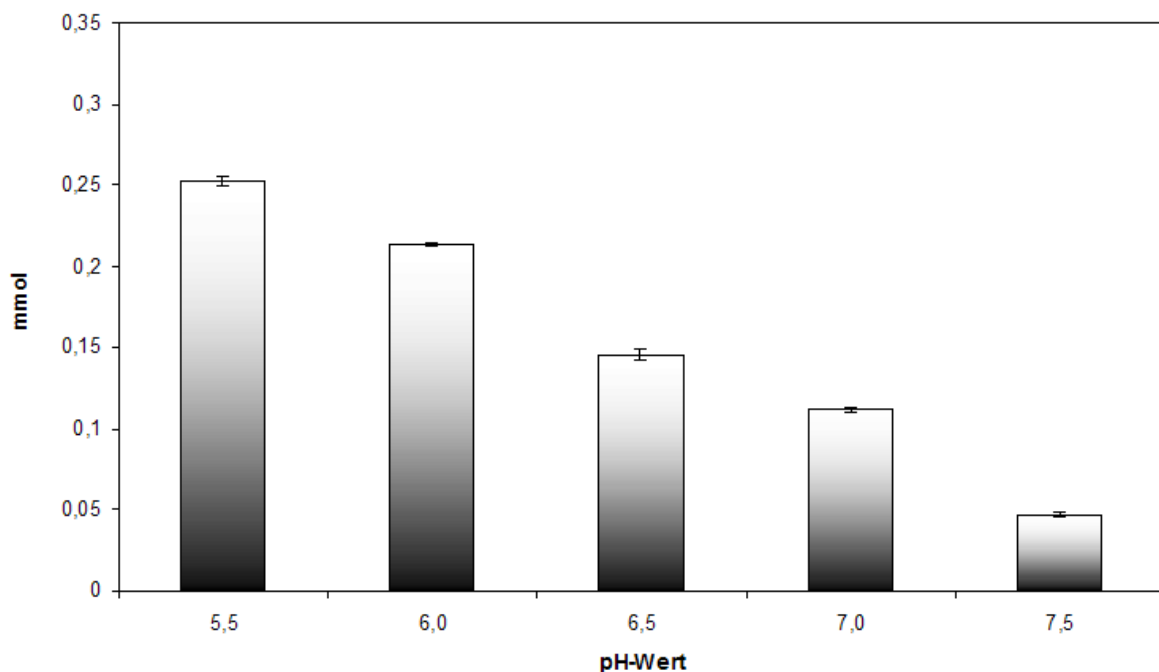


Abbildung 5.24: Anfänglich gemessene Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Gasphase während der hydrogenotrophen Methanogenese in *M. marburgensis* bei 65°C unter unterschiedlichen pH-Werten (carbonatfreies Medium).

Tabelle 5.11: Zusammenstellung der zu *M. marburgensis* bei 65°C unter unterschiedlichen pH-Werten erhaltenen Daten (carbonatfreies Medium).

pH-Wert	Kohlenstoffausbeute (%)	Produktionsrate (nmol/d)
5,5	79,36 ± 0,5	65,32 ± 1,9
6,0	77,50 ± 1,7	64,21 ± 3,6
6,5	78,89 ± 1,5	65,48 ± 0,2
7,0	76,51 ± 1,9	64,41 ± 0,6
7,5	58,81 ± 4,5	52,49 ± 3,4

Diese Beobachtung ist durch das Gleichgewicht von Kohlenstoffdioxid mit Kohlensäure und Hydrogencarbonat zu erklären, da bei höheren pH-Werten das Gleichgewicht stark auf die Produktseite verschoben wird (Schema 5.2).



Schema 5.2: Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem

Je höher der pH-Wert, desto mehr Hydroxid-Ionen stehen zur Verfügung, um die im zweiten Teilschritt produzierten Protonen abzufangen. Hierdurch stellt sich auch ein stark zur Produktseite verschobenes Gleichgewicht für den ersten Teilschritt der Reaktion ein, so dass letztendlich wenig bis kein CO<sub>2</sub> mehr in der Gasphase vorliegt.

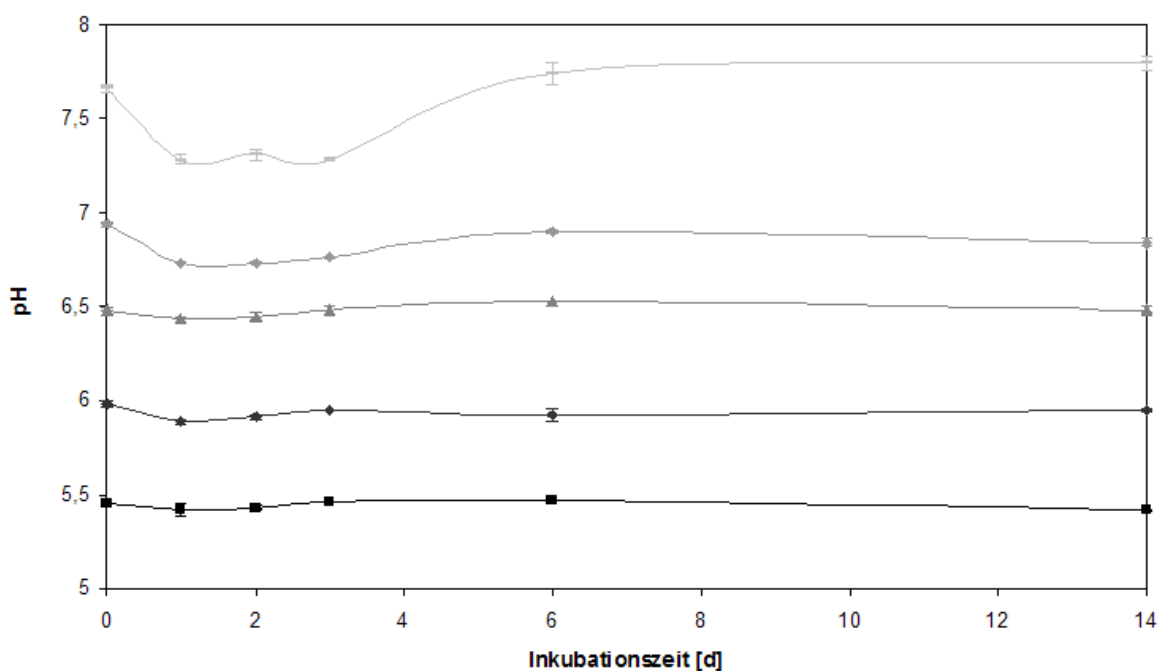


Abbildung 5.25: Im Medium von *M. marburgensis* bei 65°C gemessene pH-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Dementsprechend ist der pH-Wert bei höheren Ausgangswerten auch nicht so konstant wie dies bei niedrigeren Ausgangswerten der Fall ist (Abb. 5.25). Da ferner angenommen wird, dass eher das im Medium gelöste  $\text{CO}_2$  als das gelöste Hydrogencarbonat die aktive Spezies für die Methanogenese darstellt (Fuchs *et al.*, 1979; Thauer *et al.*, 1975; Vorholt und Thauer, 1997), ist davon auszugehen, dass somit auch die Methanproduktion im durchgeführten Versuch durch dieses Gleichgewicht beeinflusst wurde.

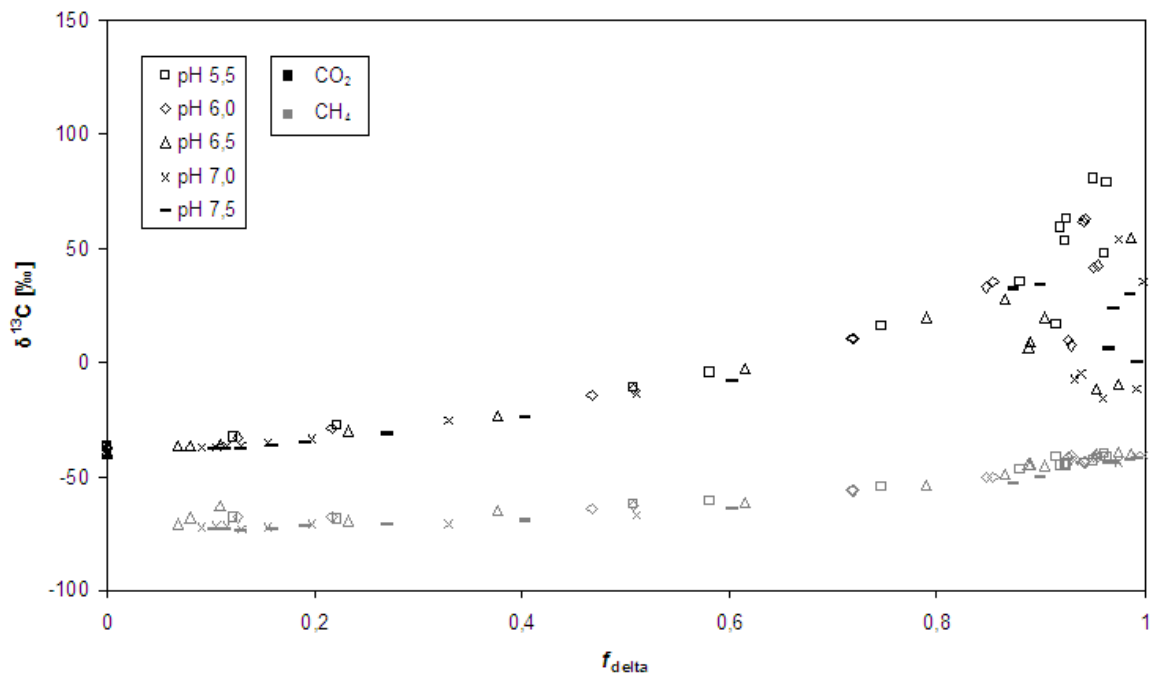


Abbildung 5.26: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte von *M. marburgensis* bei 65°C unter unterschiedlichen pH-Werten (carbonatfreies Medium) über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$  (Auftragung der Einzelwerte aller Replikate).

Ein Einfluss des pH-Wertes auf die Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte konnte während des gesamten Versuchs nicht beobachtet werden (Abb. 5.26). Unabhängig vom pH-Wert konnte ein bevorzugter Verbrauch von „leichtem“  $^{12}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  und somit die Anreicherung von „schwerem“  $^{13}\text{C}$  im verbleibenden Substrat, welches ebenfalls unabhängig vom pH-Wert mit Fortschreiten der Methanogenese verbraucht wurde, beobachtet werden. Die einzige Auffälligkeit war hier die große Streuung der Werte der Kohlenstoffisotopensignatur des gemessenen  $\text{CO}_2$  im letzten Zehntel der Reaktion, welche an einem unregelmäßigen Absinken der Werte nach 7 bis 14 Tagen lag. Dies konnte bereits im Versuch, in welchem die Kulturen bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden, beobachtet werden (Abb. 5.16). Aber so wie dies dort in keinem Zusammenhang mit der Inkubationstemperatur stand, konnte auch hier kein Zusammenhang mit dem eingestellten pH-Wert festgestellt werden und geschah willkürlich. Wie schon bei den Kohlenstoffisotopensignaturen lies sich auch bei den durch lineare Regression in den Mariotti-Plots erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten, bei deren Berechnung die

„streuenden“ Werte ausgeschlossen wurden, kein Einfluss des pH-Wertes beobachten. Unabhängig vom pH-Wert lagen hier alle Werte zwischen -38,2‰ und -30,9‰ (Tab. 5.12).

*Tabelle 5.12:* Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. marburgensis* bei 65°C unter unterschiedlichen pH-Werten (carbonatfreies Medium).

pH-Wert	$\epsilon_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
5,5	$-38,2 \pm 0,8$	$-33,1 \pm 1,7$
6,0	$-35,8 \pm 0,6$	$-35,3 \pm 1,3$
6,5	$-35,3 \pm 1,0$	$-30,9 \pm 3,0$
7,0	$-37,9 \pm 0,6$	$-34,3 \pm 1,3$
7,5	$-34,5 \pm 0,6$	$-34,8 \pm 0,8$

## 5.4 Kohlenstoffisotopenfraktionierung unter Einsatz von Inhibitoren

Weithin wird Methylfluorid als spezifischer Inhibitor der acetoklastischen Methanogenese eingesetzt, um den Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese an der Gesamtproduktion und der Kohlenstoffisotopensignatur von Methan in Umweltstudien zu ermitteln (Conrad and Klose, 1999; Janssen and Frenzel, 1997; Liu *et al.*, 2011). Allerdings wurde der Einfluss von Methylfluorid auf die methylotrophe Methanogenese bislang nicht untersucht. Um diesen Einfluss auf die methylotrophe Methanogenese zu untersuchen, wurde Reinkulturen von *Methanosarcina barkeri* und *Methanobrevibacter smithii* gasförmiges Methylfluorid in verschiedenen Konzentrationen des Gesamtansatzvolumens zugesetzt.

### 5.4.1 Methylfluorid im methylotrophen methanogenen System

Untersucht wurde hierbei das Wachstumsverhalten von *M. barkeri* und *M. zinderi* auf Methanol in Gegenwart von 0% bis 3% Methylfluorid.

*Tabelle 5.13:* Methanproduktionsraten in der Phase höchster methanogener Aktivität und Kohlenstoffausbeuten bei 37°C unter verschiedenen Konzentrationen an Methylfluorid in *M. barkeri* und *M. zinderi*.

MeF	<i>M. barkeri</i>		<i>M. zinderi</i>	
	Kohlenstoff- ausbeute (%)	Produktionsrate (mmol/d)	Kohlenstoff- ausbeute (%)	Produktionsrate (mmol/d)
0%	64,81	1,10	92,74	0,99
1%	58,63	0,81	68,29	1,09
2%	77,85	1,24	93,55	0,87
3%	83,89	1,09	79,07	0,91
Durchschnitt	$71,29 \pm 5,8$	$1,06 \pm 0,1$	$83,41 \pm 6,0$	$0,97 \pm 0,0$



Ein Einfluss des Methylfluorids auf Wachstum, Ausbeute und Produktionsrate war gegenüber den ungehemmten Proben in beiden Kulturen nicht zu erkennen (Tab. 5.13). Allein die Lag-Phase in der Inkubation von *M. zinderi* hat sich bei einer Zugabe von 3% Methylfluorid deutlich verlängert. Ob dies allerdings eine Auswirkung des Methylfluorids war oder lediglich eine Anomalie im Wachstumsverhalten konnte nicht geklärt werden.

Ebenfalls konnte kein Einfluss des Methylfluorids auf die Änderungen der Kohlenstoffisotopensignatur innerhalb der untersuchten Kulturen beobachtet werden. Unabhängig von der Konzentration an Methylfluorid in der Gasphase der untersuchten Kulturen verhielten sich die Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte wie in den ungehemmten Inkubationen (Abb. 5.27).

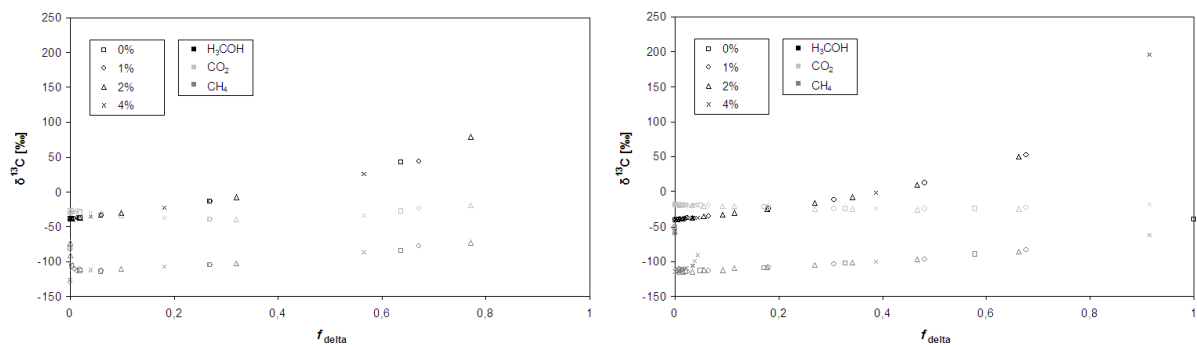


Abbildung 5.27: Kohlenstoffisotopensignaturen von Substraten und Produkten von *M. barkeri* (links) und *M. zinderi* (rechts) bei 37°C unter verschiedenen Konzentrationen an Methylfluorid über den Verbrauch der Reaktanden  $f_{\text{delta}}$ .

Durch dieses ähnliche Verhalten war folglich auch kein Einfluss auf die Fraktionierungskoeffizienten zu erkennen. Die Fraktionierungskoeffizienten während der methylotrophen Methanogenese lagen in allen Fällen zwischen -79,9‰ und -73,6‰ für *M. barkeri* und -82,4‰ und -74,2‰ für *M. zinderi* (Tab. 5.14).

Tabelle 5.14: Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. barkeri* und *M. zinderi* bei 37°C unter verschiedenen Konzentrationen an Methylfluorid.

MeF	<i>M. barkeri</i>		<i>M. zinderi</i>	
	$\epsilon_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (‰)	$\epsilon_{\text{CH}_4}$ (‰)
0%	$-79,6 \pm 0,1$	$-76,9 \pm 1,7$	$-80,2 \pm 0,9$	$-75,4 \pm 1,6$
1%	$-73,6 \pm 0,7$	$-77,3 \pm 1,7$	$-81,6 \pm 0,7$	$-75,1 \pm 1,9$
2%	$-79,9 \pm 0,1$	$-75,0 \pm 2,5$	$-82,4 \pm 1,0$	$-74,2 \pm 1,7$
3%	$-76,0 \pm 0,0$	$-75,4 \pm 0,6$	$-78,8 \pm 0,9$	$-76,5 \pm 6,0$

## 6 Diskussion

### 6.1 „Fraktionierungsfenster“ der verschiedenen Stoffwechselwege

In früheren Studien zeigten Vergleiche der Fraktionierungskoeffizienten für die drei wichtigsten Arten der Methanogenese, dass diese in sich voneinander unterscheidenden Bereichen liegen (Tab. 6.1). Hierbei wies die acetoklastische Methanogenese in der Regel mit -35‰ bis -5‰ die schwächste Fraktionierung auf (Goevert und Conrad, 2009; Valentine *et al.*, 2004), während die Fraktionierung der hydrogenotrophe Methanogenese mit -60‰ bis -28‰ in einem größeren und tieferen Bereich lag (Valentine *et al.*, 2004). Die stärkste Fraktionierung konnte jedoch während der methylotrophen Methanogenese beobachtet werden. Krzycki *et al.* (1987) erhielt in *Methanosarcina barkeri* während der Konsumption von Methanol eine durchschnittliche Fraktionierung von  $\epsilon_{\text{CH}_4\text{-methanol}} = -79\text{‰}$ . Allerdings basierte sowohl diese Studie als auch der Großteil der Studien in hydrogenotrophen Systemen auf den Messungen der Kohlenstoffisotopen zu Reaktionsbeginn und -ende in offenen Gas-Systemen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse innerhalb geschlossener Systeme bestätigen die bisherigen Ergebnisse sowohl für die hydrogenotrophe als auch für die methylotrophe Methanogenese. Es konnte sowohl der von Krzycki *et al.* in *M. barkeri* erhaltene Fraktionierungskoeffizient als auch der von Valentine *et al.* in *Methanosarcina marburgensis* erhaltene Fraktionierungskoeffizient bestätigt werden. Im Einzelnen bedeutete dies Fraktionierungskoeffizienten von  $\epsilon_{\text{CO}_2} = -33,9\text{‰}$  und  $\epsilon_{\text{CH}_4} = -30,9\text{‰}$  für *M. marburgensis* und von  $\epsilon_{\text{methanol}} = -73,5\text{‰}$  und  $\epsilon_{\text{CH}_4} = -76,1\text{‰}$  für *M. barkeri*.

Dieses Ergebnis konnte ebenfalls für andere Organismen auf gleichen Substraten bestätigt werden. In einer zweiten untersuchten *Methanosarcina* sp., *M. acetivorans*, wurde mit  $\epsilon_{\text{methanol}} = -72,0\text{‰}$  und  $\epsilon_{\text{CH}_4} = -71,6\text{‰}$  eine ähnliche Kohlenstoffisotopenfraktionierung wie in *M. barkeri* beobachtet. Ebenfalls war mit  $\epsilon_{\text{methanol}} = -83,4\text{‰}$  und  $\epsilon_{\text{CH}_4} = -77,9\text{‰}$  der in *Methanlobus zinderi* erhaltene Fraktionierungskoeffizient ähnlich. Insgesamt wurde somit innerhalb der methylotrophen Methanogenen tatsächlich eine sehr starke Fraktionierung der Kohlenstoffisotope während der Umwandlung von Methanol zu Methan festgestellt, deren zugehörige Koeffizienten in einem relativ schmalen „Fraktionierungsfenster“ von -72‰ bis -83‰ liegen.

Obwohl alle untersuchten methylotrophen Methanogenen der Familie *Methanosarcinaceae* angehören, gibt es trotzdem bei den Fraktionierungskoeffizienten innerhalb der Familie Unterschiede. Diese Unterschiede finden wahrscheinlich ihren Ursprung in der Phänotypologie der verschiedenen Gattungen. Während die hier untersuchten *Methanosarcina* spp. ein breites Substratspektrum aufweisen und Methan aus vielen verschiedenen Substraten wie Acetat,  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , Methanol, Methylaminen und methylierten Sulfiden produzieren können (Londry *et al.*, 2008), ist *Methanlobus zinderi* nur in der Lage methylierte Verbindungen zu verwenden (Doerfert *et al.*, 2009). Aufgrund dessen gibt es

scheinbar innerhalb dieses Organismus eine noch größere Affinität zum „leichteren“  $^{12}\text{C}$ -Methanol als es in den untersuchten *Methanosarcina* spp. der Fall ist.

Tabelle 6.1: Vergleich der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von methanogenen Reinkulturen.

Organismus	Stammnummer DSMZ	Substrat	Temp. [°C]	Fraktionierungskoeffizient [‰]			Referenz
				$\epsilon_{\text{Substrat}}$	$\epsilon_{\text{CH}_4}$	$\epsilon_{\text{CH}_4\text{-Substrat}}^a$	
<i>Methanosarcina barkeri</i>	800	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	36			-49	Krzycki et al. (1987)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	<sup>b</sup>	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	40			-41	Games et al. (1978)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	804	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	37			-45 <sup>c</sup>	Londry et al. (2008)
<i>Methanobacterium bryantii</i>	863	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	40			-56	Games et al. (1978)
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	1053	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	65	-38 <sup>d</sup>	-3 <sup>d</sup>		diese Arbeit
<i>Methanococcus vannieli</i>	1224	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	35			-60 <sup>e</sup>	Botz et al. (1996)
<i>Methanobacterium formicicum</i>	1535	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	34			-48	Balabane et al. (1987)
<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	2095	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	65			-53	Botz et al. (1996)
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	2133	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	65			-28 <sup>f</sup>	Valentine et al. (2004)
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	2133	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	65	-34	-31		diese Arbeit
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	2133	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	65	-37 <sup>d</sup>	-31 <sup>d</sup>		diese Arbeit
<i>Methanobacterium ivanovii</i>	2611	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	37			-34	Belyaev et al. (1983)
<i>Methanococcus igneus</i>	5666	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	85			-50 <sup>g</sup>	Botz et al. (1996)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	800	Acetat	37			-22	Krzycki et al. (1987)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	804	Acetat	37			-35	Londry et al. (2008)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	1538	Acetat	37	-24	-12		Gelwicks et al. (1994)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	804	Acetat	30	-31	-27		Goevert et al. (2009)
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	2834	Acetat	37	-35	-24		Goevert et al. (2009)
<i>Methanosaeta concilii</i>	3671	Acetat	37	-14	-9		Penning et al. (2006)
<i>Methanosaeta thermophila</i>	3870	Acetat	61		-5 <sup>h</sup>		Valentine et al. (2004)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	800	Methanol	37			-79	Krzycki et al. (1987)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	804	Methanol	37			-83	Londry et al. (2008)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	800	Methanol	37	-74	-76		diese Arbeit
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	2834	Methanol	37	-72	-72		diese Arbeit
<i>Methanobolus zinderi</i>	21339	Methanol	37	-83	-78		diese Arbeit
<i>Methanosarcina barkeri</i>	800	Trimethylamin	37			-53	Summons et al. (1998)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	804	Trimethylamin	38			-67	Londry et al. (2008)
<i>Methanococcoides burtonii</i>	6242	Trimethylamin	20			-73	Summons et al. (1998)

<sup>a</sup>  $\epsilon_{\text{CH}_4\text{-Substrat}}$  bezeichnet in offenen Systemen durch Differenzbildung erhaltene Ergebnisse

<sup>b</sup> nicht angegeben, wahrscheinlich DSM 800

<sup>c</sup> unter Substratsättigung; -80‰ unter Substratlimitierung

<sup>d</sup> unter Wasserstofflimitierung

<sup>e</sup> im Glasfermenter; -69‰ im Titanfermenter

<sup>f</sup> unter Wasserstoffsättigung; -58‰ unter Wasserstofflimitierung

<sup>g</sup> im Glasfermenter; -55‰ im Titanfermenter

<sup>h</sup> Durchschnittswert aus den Versuchen A-1, A-2 und A-3

Um zu verstehen, warum die drei beschriebenen Stoffwechselwege so unterschiedlich fraktionieren, kann man sich deren Biochemie vor Augen führen (Abb. 6.1). Es wird klar, dass bei der Umwandlung von Methanol zu Methan lediglich zwei Enzyme (Methanol:Coenzym M-Methyltransferase und Methyl-Coenzym M-Reduktase), während der Spaltung von Acetat zu Methan drei Enzyme und bei der Reduktion von  $\text{CO}_2$  sogar sieben unterschiedliche Enzyme Einfluss auf den umgesetzten Kohlenstoff haben. In allen drei Stoffwechselwegen wird allerdings der letzte Schritt von der Methyl-Coenzym M-Reduktase

katalysiert. Wenn die Fraktionierung denn überhaupt eine Folge der beiden Enzymreaktionen ist, kann somit während der methylo trophen Methanogenese nur das andere an der Umwandlung beteiligte Enzym, die Methanol:Coenzym M-Methyltransferase, den Ausschlag für die sehr starke Fraktionierung geben. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass die starke Fraktionierung in der Verzweigung des Stoffwechselweges liegt, so dass hauptsächlich „leichtes“  $^{12}\text{C}$  in Methan umgewandelt wird, während das „schwerere“  $^{13}\text{C}$  zu  $\text{CO}_2$  umgewandelt wird oder gar nicht umgesetzt wird und als „Restmethanol“ im Medium zurückbleibt. Die für die Reduktion von Methanol zu Methan benötigten Elektronen werden durch die gleichzeitige Oxidation von Methanol zu  $\text{CO}_2$  und somit durch die Umkehrung des hydrogenotrophen Stoffwechselweges erzeugt. Hierbei wird, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, tatsächlich das aus Methanol produzierte  $\text{CO}_2$  nicht so stark an „schwerem“  $^{13}\text{C}$  abgereichert wie das produzierte Methan. Das zu Beginn neu gebildete  $\text{CO}_2$  weist eine Kohlenstoffisotopie, wenn diese aus der Kohlenstoffisotopensignatur des gesamten  $\text{CO}_2$  extrapoliert wird, von ungefähr  $\delta_{\text{CO}_2} = -60\text{‰}$  auf. Dies würde auf einen Fraktionierungskoeffizienten bei der Umwandlung von Methanol zu  $\text{CO}_2$  von nur  $\epsilon_{\text{CO}_2\text{-Methanol}} \approx -20\text{‰}$  hindeuten.

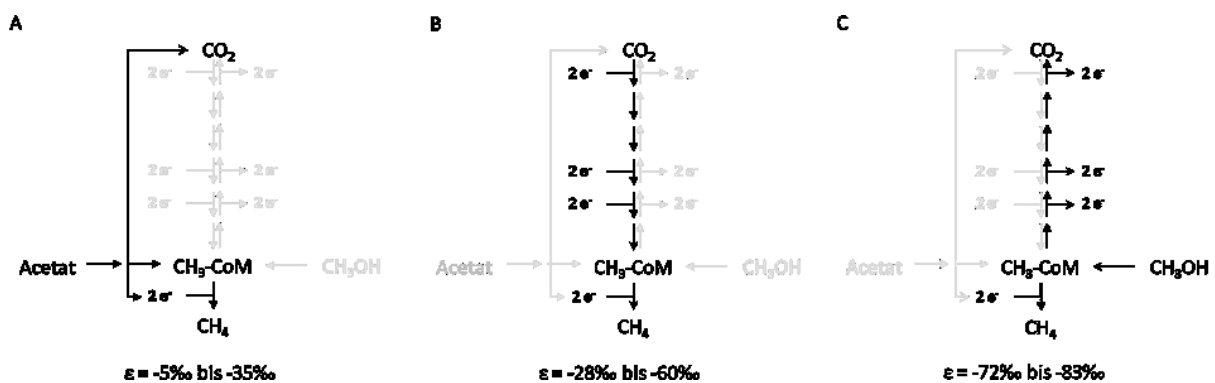


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Methanogenese aus Acetat (A),  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (B) und Methanol (C). Nicht verwendete Teilschritte sind ausgegraut; Redox-Reaktionen werden durch  $2\text{e}^-$  dargestellt.  $\text{CH}_3\text{-CoM}$  = Methyl-Coenzym M.

Ebenso könnte auch die starke Fraktionierung (im Bereich von  $-53\text{‰}$  bis  $-73\text{‰}$ ), wenn andere methylierte Verbindungen wie Trimethylamin (Tabelle 6.1) als Substrat dienen, erklärt werden, da sich bei der Disproportionierung einer Methylverbindung in  $\text{CO}_2$  und Methan gegenüber der von Methanol ausgehenden Methanogenese lediglich das erste Enzym, welches der Aktivierung der Methylgruppe dient, unterscheidet.

Dies bedeutet allerdings, dass, wenn die für die Reduktion von Methanol zu Methan benötigten Elektronen durch die Oxidation von Wasserstoff erzeugt werden, eine andere Fraktionierung zu erwarten wäre, da das „schwerere“  $^{13}\text{C}$ -Methanol nicht mehr größtenteils zu  $\text{CO}_2$  umgewandelt würde sondern vollständig der Bildung von Methan zur Verfügung stünde. Eine Zugabe von Wasserstoff zu Inkubationen von *M. zinderi* zeigte allerdings keinerlei

Einfluss auf das allgemeine Wachstum oder die Kohlenstoffisotopenfraktionierung während der Methanogenese.

In mehreren *Methanosarcina* spp. existieren im reduktiven Zweig der methylotropen Methanogenese zwei Enzyme zur Reduktion von Methanophenazin (Abb. 6.2). Zum einen die membranständige  $F_{420}H_2$ :Heterodisulfid-Oxidoreduktase und die ebenfalls membrangebundene  $H_2$ :Heterodisulfid-Oxidoreduktase (Deppenmeier *et al.*, 1999). Während die  $F_{420}H_2$ :Heterodisulfid-Oxidoreduktase die benötigten Elektronen zur Reduktion von Methanophenazin durch die Oxidation des reduzierten Cofaktors  $F_{420}$  gewinnt, oxidiert die  $H_2$ :Heterodisulfid-Oxidoreduktase elementaren Wasserstoff zu  $H^+$ -Ionen. Da in *M. zinderi* allerdings trotz des höheren Energiegewinns bei der Oxidation des Wasserstoffs gegenüber der Oxidation des Cofaktors (Deppenmeier, 2004) kein Verbrauch des zugegebenen Wasserstoffs beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, dass in diesem Organismus die  $H_2$ :Heterodisulfid-Oxidoreduktase nicht exprimiert wird. Dies hätte zur Folge, dass im oxidativen Zweig durch die Ech-Hydrogenase gebildeter intermediärer Wasserstoff im reduktiven Zweig nicht genutzt werden würde. Da aber die Ausbeute an Methan nicht geringer als erwartet ausfiel, scheint der Organismus einen anderen Weg der Elektronenübertragung zu verwenden. Möglicherweise handelt es sich hierbei wie in *M. acetivorans* um einen Rnf-ähnlichen Komplex, welcher die Ech-Hydrogenase ersetzt (Li *et al.*, 2006). *M. zinderi* wurde allerdings erstmals aus dem salzhaltigen Wasser eines Kohleflözes isoliert (Doerfert *et al.*, 2009). Die Abwesenheit der  $H_2$ :Heterodisulfid-Oxidoreduktase würde somit einen evolutionären Nachteil gegenüber anderen Methanogenen bedeuten, da gerade in diesem Lebensraum vorkommende größeren Mengen Wasserstoffs nicht zur Energiegewinnung genutzt werden könnten. Die durch Fehlen eines oxidativen Zweigs postulierte geringere Fraktionierung für die methylotrophe Methanogenese kann somit nur in einem anderen Organismus, der wie *M. barkeri* fähig ist unter Konsumption von elementarem Wasserstoff aus Methanol Methan zu produzieren, überprüft werden.

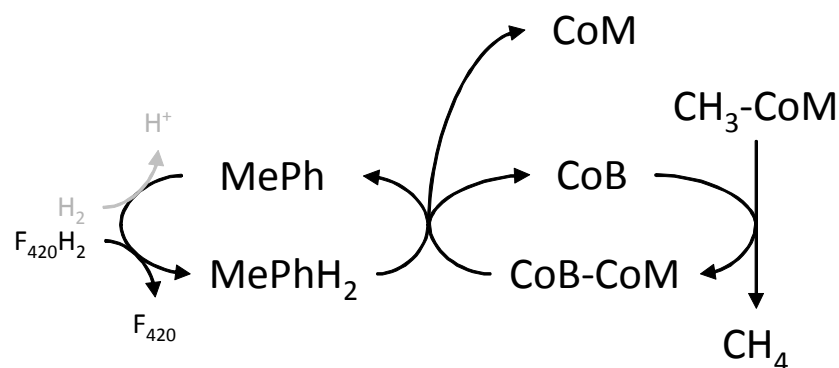


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des reduktiven Zweigs der methylotropen Methanogenese.  $CH_3$ -CoM = Methyl-Koenzym M; CoB = Coenzym B; CoM = Coenzym M; CoB-CoM = gemischtes Disulfid aus CoB und CoM;  $F_{420}$  und  $F_{420}H_2$  = oxidierte und reduzierte Cofaktor  $F_{420}$ ; MePh und MePhH<sub>2</sub> = oxidiertes und reduziertes Methanophenazin.

Im Fraktionierungskoeffizienten der hydrogenotrophen Methanogenese spiegelt sich der für die Umwandlung von Methanol zu CO<sub>2</sub> im oxidativen Zweig der methylotrophen Methanogenese angenommene Fraktionierungskoeffizient von  $\epsilon_{\text{CO}_2\text{-Methanol}} \approx -20\text{‰}$  nicht wieder. Hierbei sind bei der Umwandlung von CO<sub>2</sub> zum Methyl-Coenzym M zwar die gleichen sechs Enzyme in umgekehrter Richtung beteiligt, aber da meistens der erste Schritt eine Enzymkette auch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, ist in diesem Fall ein anderes Enzym für die Fraktionierung verantwortlich. Folglich tritt für die Enzymkette zwischen CO<sub>2</sub> und Methyl-Coenzym M abhängig von der Richtung eine unterschiedliche Fraktionierung auf, da entweder die Formylmethanofuran-Dehydrogenase (hydrogenotrophe Methanogenese) oder die Tetrahydromethanopterin S-Methyltransferase (methylotrophe Methanogenese) den Einstieg in die Enzymkette bilden und sich somit für die gesamte Fraktionierung verantwortlich zeigen.

Vorherige Studien zeigten zusätzlich, dass die Fraktionierung während der hydrogenotrophen Methanogenese durch die Limitierung von Wasserstoff verstärkt wird (Penning *et al.*, 2005; Valentine *et al.*, 2004). Durch die Limitierung des Wasserstoffs wird die Reaktivierung der Enzyme verlangsamt und es findet eine stärkere Bevorzugung des „leichteren“ <sup>12</sup>C-CO<sub>2</sub> statt als dies im nicht limitierten Zustand der Fall ist. Allerdings scheint dieses sich nicht so einfach auf geschlossene Systeme übertragen zu lassen, da es im geschlossenen System zunächst eine gewisse Zeit benötigt bis sich die Begrenzung des Wasserstoffs durch eine Verlangsamung der Enzymreaktivierung manifestieren kann. Dies führt hier somit nicht durch eine daraus folgende Energielimitierung zu einer starken Bevorzugung des leichteren Isotops sondern lediglich zu einem verfrühten Reaktionsabbruch.

Wie die Versuche mit *M. marburgensis* und *M. thermautotrophicus* zeigen ist es somit von entscheidender Bedeutung in welchem System die Fraktionierungskoeffizienten bestimmt werden. Während sich bei unlimitierten Bedingungen offene und geschlossene Systeme kaum unterscheiden, können diese unter nicht stöchiometrischen Bedingungen nicht mehr miteinander verglichen werden. Zusätzlich muss beachtet werden, dass im geschlossenen System bei Begrenzung des Wasserstoffs aufgrund des geringen Umsatzes eine Bestimmung des Fraktionierungskoeffizienten über die Produktdaten in den meisten Fällen nicht mehr durchgeführt werden kann. Somit ist auf diese Weise eine Bestimmung des Fraktionierungskoeffizienten im geschlossenen System nur für nicht limitierte Bedingungen möglich, da die Simulation einer „natürlichen“ Wasserstofflimitierung stark erschwert ist. Diese gelingt nur bei einer kontinuierlichen Zugabe oder Produktion von geringen Mengen Wasserstoffs wie Penning *et al.* (2005) beispielsweise durch den Abbau von Glukose und Cellobiose durch Clostridien bewerkstelligte.

Die im geschlossenen System erhaltenen Ergebnisse stellen allerdings eine Bestätigung für die verschiedenen „Fraktionierungsfenster“ der verschiedenen Stoffwechselwege dar, da anhand dieser die Quellen des von Umweltproben emittierten Methans identifiziert werden können. Durch die während der Methanogenese erhaltene Gesamtfraktionierung kann mithilfe

der „Fraktionierungsfenster“ bestimmt werden wie hoch jeweils der Anteil des über die verschiedenen Stoffwechselwege produzierten Methans ist (Conrad, 2005).

Hingegen zeigen die Ergebnisse, dass eine umgekehrte Bestimmung zu welchem Produkt CO<sub>2</sub> umgesetzt wird nicht möglich sein dürfte. Die Fraktionierung bei der Homoacetogenese fiel im Vergleich zur hydrogenotrophen Methanogenese bei Verbrauch gleicher Substrate im geschlossenen System aufgrund eines anderen Stoffwechselweges nur leicht höher aus. Im Falle von *T. kivui* bedeutete dies Fraktionierungskoeffizienten von  $\epsilon_{\text{CO}_2} = -40,6\text{‰}$  und  $\epsilon_{\text{Acetat}} = -44,3\text{‰}$ . Bei der Homoacetogenese findet eine CO<sub>2</sub>-Fixierung durch die Aufnahme von CO<sub>2</sub> über zwei unterschiedliche Zweige des reduktiven Acetyl-CoA-Weg statt. In Bakterien wird hierbei zu Beginn ein Molekül CO<sub>2</sub> im Methyl-Zweig durch die Formiatdehydrogenase zu Formiat reduziert, während ein weiteres im Carbonyl-Zweig durch die CO-Dehydrogenase zu Kohlenstoffmonoxid reduziert wird. Während die CO-Dehydrogenase den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Carbonyl-Zweig darstellt, gilt dies nicht für die Formiatdehydrogenase im Methyl-Zweig. Aufgrund einer Anreicherung von Formiat im Medium scheint erst der Folgeschritt, die durch die 10-Formyl-THF-Synthetase katalysierte Kondensation des Formiats mit Tetrahydrofolat zu N<sub>10</sub>-Formyl-FH<sub>4</sub>, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein, welcher somit vermutlich für die Fraktionierung verantwortlich ist. In den folgenden Reaktionen wird die Formylgruppe zu einer Methylgruppe reduziert. Diese Methylgruppe wird dann nach Aktivierung zusammen mit dem Kohlenstoffmonoxid aus dem Carbonylzweig durch die Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgesetzt. Bei der Bildung des hieraus freigesetzten Acetats sind somit andere Enzyme für die Kohlenstoffisotopenfraktionierung verantwortlich als bei der Bildung von Methan während der hydrogenotrophen Methanogenese. Aber trotzdem ist der Unterschied der Fraktionierungskoeffizienten so gering, dass eine Unterscheidung der beiden Stoffwechselwege anhand der Fraktionierungskoeffizienten nicht möglich ist. Dies zeigt sich auch daran, dass das in der Literatur für die der homoacetogenen Bakterien beschriebene „Fraktionierungsfenster“ sich mit Werten von -41‰ bis -68‰ (Dreisbach *et al.*, 2012) ebenfalls in einem großen Bereich mit dem der hydrogenotropen Methanogenese überschneidet.

## 6.2 „Natürliche“ Einflüsse auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung

Da Umweltproben aber meist nicht unter Optimalbedingungen für alle enthaltenen Mikroorganismen inkubiert werden, ist es äußerst wichtig die Auswirkungen von externen Einflüssen auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung zu untersuchen. Der möglicherweise wichtigste Einflussfaktor stellt hierbei wahrscheinlich die Temperatur dar, da sich nicht nur nach Herkunft einer Umweltprobe die optimale Wachstumstemperatur der darin lebenden Mikroorganismen stark unterscheidet sondern sogar innerhalb der einzelnen Umweltproben Mikroorganismen mit unterschiedlichen Wachstums-optima auftreten. Somit kann sich je nach

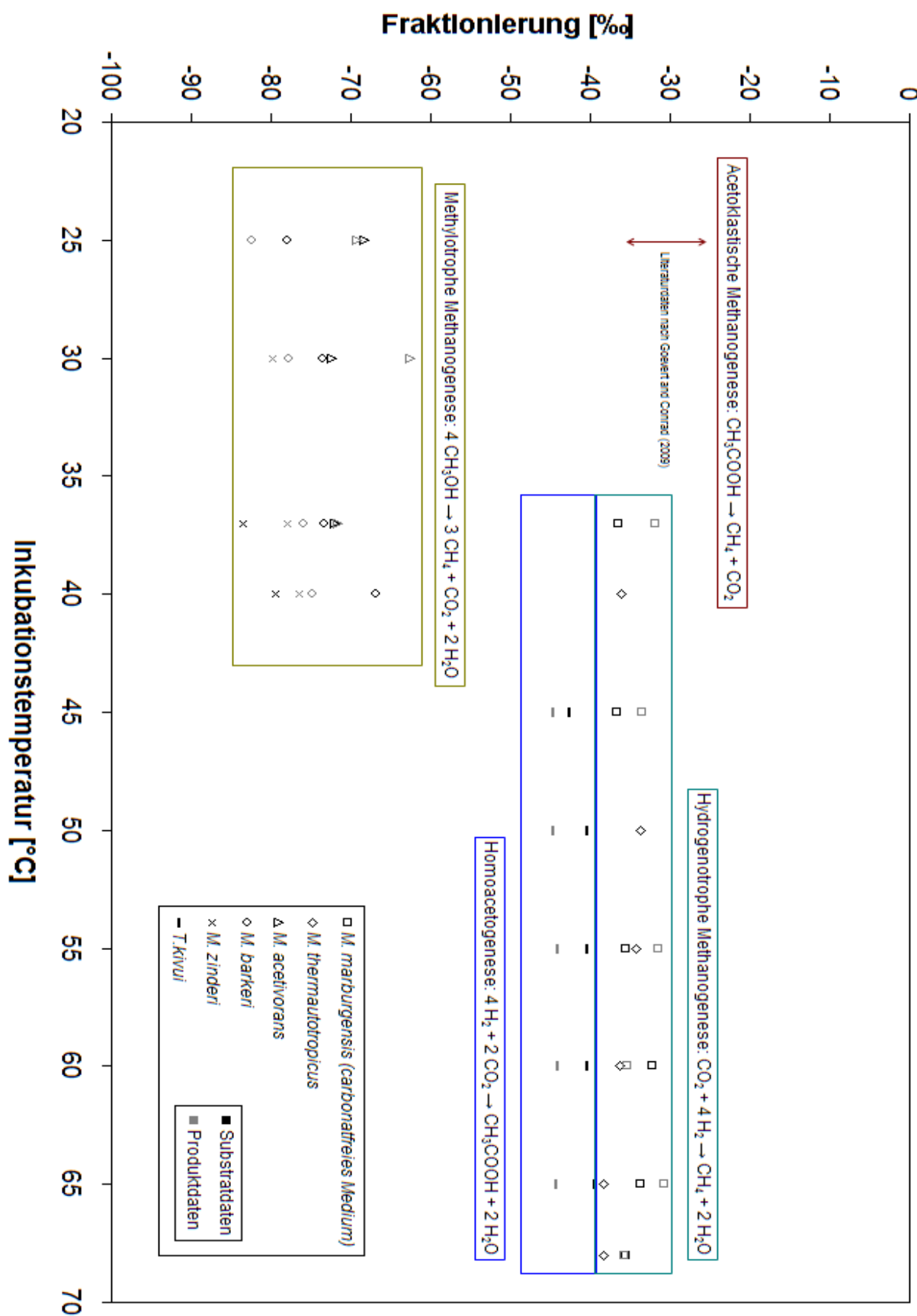


Abbildung 6.3: Grafische Auftragung der im geschlossenen System erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) aller untersuchten Organismen in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur.



Inkubationstemperatur die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft ändern (Chin *et al.*, 1999; Noll *et al.*, 2010). Zur Bestimmung der Quellen des emittierten Methans ist es also unabdingbar die Stabilität der Fraktionierung gegenüber der Temperatur zu kennen, da eine starke Änderung des Fraktionierungskoeffizienten mit der Abweichung vom Wachstumsoptimum eine Fehlinterpretation der während der Methanogenese erhaltenen Gesamtfraktionierung zur Folge hätte.

Frühere Studien zeigten für die Fraktionierung von Kohlenstoffisotopen innerhalb unterschiedlicher Lebewesen verschiedenste Abhängigkeiten und Nicht-Abhängigkeiten zur Temperatur. Zum Beispiel zeigte die Fraktionierung bei der Nahrungsaufnahme des Europäischen Wolfsbarschs signifikante Temperaturabhängigkeiten (Barnes *et al.*, 2007) wogegen die Fraktionierung bei der Photosynthese innerhalb von Weichweizen (*Triticum aestivum* L.) oder Reispflanzen (*Oryza sativa* L.) keine Temperaturabhängigkeiten aufweist (Troughton und Card, 1975).

Mikroorganismen sind diesbezüglich noch weniger untersucht. In sulfatreduzierenden Bakterien zeigte sich ein direkter Einfluss der Temperatur auf die Fraktionierung (Canfield *et al.*, 2006). Dieser betrug allerdings bei einer Temperaturänderung von 35°C nur 8‰ und war weder linear von der Temperatur noch von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig.

Für methanogene Archaeen konnte hingegen im offenen Systemen über einen gleich großen Temperaturbereich kein Temperatureinfluss auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung beobachtet werden (Valentine *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur Wasserstofflimitierung hatte die Verlangsamung der Reaktion durch eine Abweichung von der optimalen Wachstumstemperatur keinen erkennbaren Einfluss auf den Fraktionierungskoeffizienten der Methanogenese in *M. marburgensis*. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit für die Fraktionierung innerhalb eines geschlossenen Systems bestätigt werden. Alle für *M. marburgensis* erhaltenen Fraktionierungskoeffizienten lagen zwischen -36,9‰ und -30,9‰. Die Fraktionierung lag während der Methanogenese in *M. thermautotrophicus* im carbonathaltigen Medium mit Werten zwischen -38,4‰ und -33,7‰ nur minimal niedriger, zeigte damit aber auch keine größere Beeinflussung durch die Inkubationstemperatur. Zusätzlich fällt auch der Einfluss der Temperatur auf die Fraktionierung methylotropher methanogener Archaeen sowie homoacetogener Bakterien ebenfalls sehr gering aus (Abb. 6.3).

Für die methylotrophen Archaeen wurde über alle beobachteten Temperaturen Fraktionierungskoeffizienten in einem Bereich von -83,4‰ bis -62,6‰ ermittelt. Im Vergleich dazu lagen die Fraktionierungskoeffizienten am Wachstumsoptimum im Bereich von -83,4‰ bis -71,6‰. Damit wurde durch die nicht optimalen Temperaturbedingungen während des Wachstums in keinem Fall das „Fraktionierungsfenster“ zu stärkeren Fraktionierungen hin vergrößert.

In *T. kivui* wurden während der Homoacetogenese Fraktionierungskoeffizienten zwischen -44,9‰ und -39,6‰ berechnet. Somit wird innerhalb von Umweltproben auch durch die

bakterielle Umsetzung von  $\text{CO}_2$  zu Acetat der aus der Kohlenstoffisotopensignatur von  $\text{CO}_2$  berechnete Fraktionierungskoeffizient nicht durch Temperaturänderungen beeinflusst.

In keinem der untersuchten Fälle ist eine Abhängigkeit der Änderungen des Fraktionierungskoeffizienten zur Temperatur auszumachen. Dies bedeutet, dass entweder gar keine Temperaturabhängigkeit besteht oder diese zumindest kleiner ist als die ohnehin vorhandene Differenzen zwischen den aus den Kohlenstoffisotopensignaturen der Substrate und Produkte erhaltenen Werten. In dem Fall wäre die Auflösung eines Temperatureffektes mit den hier verwendeten Methoden messtechnisch nicht möglich.

Dass die Temperatur im Gegensatz zur Fraktionierung in Reinkulturen einen Einfluss auf die Gesamtfractionierung der Methanogenese in Umweltproben hat, haben bereits vorausgegangene Studien gezeigt (Fey *et al.*, 2004). Wobei die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dies seine alleinigen Gründe in der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften haben dürfte. Aufgrund veränderter Temperaturen sinkt die Umsatzrate mancher Organismen während die anderer steigt. Hierdurch steigt dann auch die Biomasseproduktion derer Organismen deren Umsatzrate steigt. Aufgrund dieser Verschiebungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften ändert sich dann auch der Verbrauch der Substrate und in der Folge der Anteil der verschiedenen methanogenen Stoffwechselwege an der gesamten Methanproduktion. Fey *et al.* (2004) haben beispielsweise gezeigt, dass im Reisfeldboden bei niedrigen Temperaturen der acetoklastische Stoffwechselweg stark bevorzugt wird, wohingegen bei höheren Temperaturen das Methan fast ausschließlich hydrogenotroph erzeugt wird.

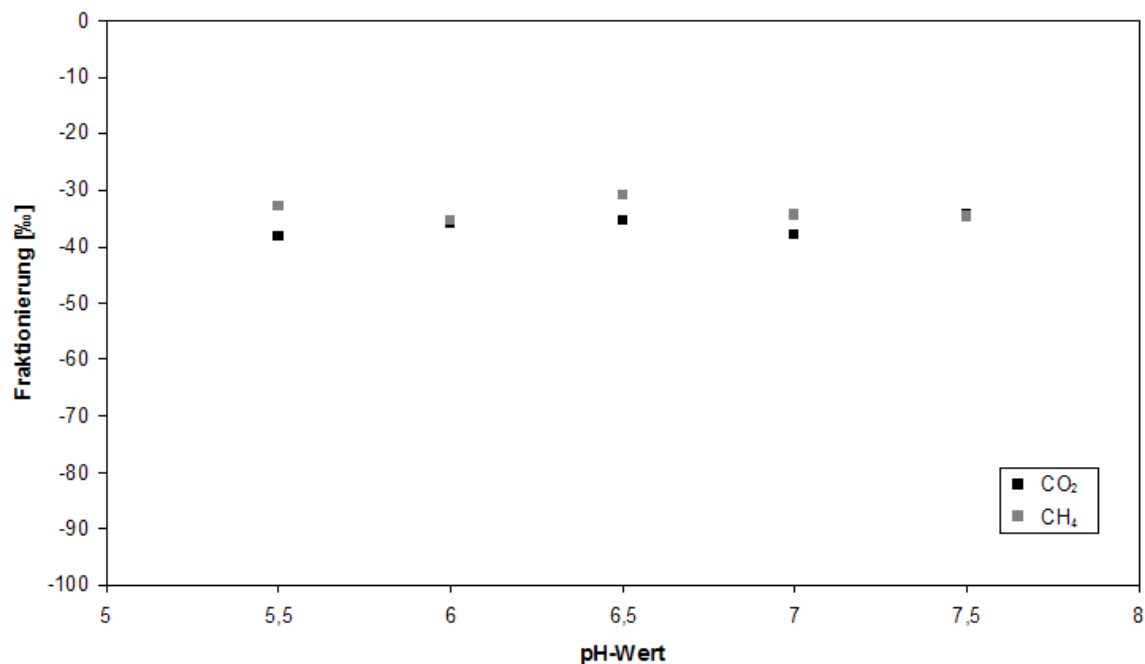


Abbildung 6.4: Grafische Auftragung der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. marburgensis* bei 65°C in Abhängigkeit des pH-Wertes (carbonatfreies Medium).

Neben der Temperatur ist ein sich in der Umwelt ändernder Faktor der pH-Wert. Dieser ist bei der Inkubation von Bodenproben neben der Herkunft des Bodens auch abhängig von der Konzentration an Acetat und Carbonat. Da beides sowohl Substrat als auch Produkt während des anaeroben Abbaus von organischem Material ist, kann sich der pH-Wert auch im Laufe der Inkubation ändern. Aber auch hier zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Fraktionierung. Unter experimentell veränderten pH-Werten wurden Fraktionierungskoeffizienten von -38,2‰ bis -30,9‰ erhalten (Abb. 6.4). Damit vergrößerte sich zwar das „Fraktionierungsfenster“, aber es war kein direkter Zusammenhang zum eingestellten pH-Wert erkennbar. Dies bedeutet, dass Änderungen des Fraktionierungskoeffizienten der Gesamtfraktionierung in einer Umweltprobe eine Verlagerung der Stoffwechselwege bedeuten und nicht durch den pH-Wert beeinflusst werden. Dieser kann natürlich indirekt Einfluss ausüben indem bei einer Änderung des pH-Wertes wie auch bei der Änderung der Temperatur für manche Mikroorganismen Vorteile gegenüber anderen Mikroorganismen generiert werden, was sich wiederum in einer Veränderung der Anteile der verwendeten Substrate niederschlägt.

### 6.3 Kohlenstoffisotopenfraktionierung beim Einsatz von Inhibitoren

In vielen Studien wurde eine Konzentration von 2% Methylfluorid verwendet, um die acetoklastische Methanogenese zu hemmen (Conrad et al., 2007; Conrad et al., 2010a; Conrad et al., 2010b; Conrad et al., 2011; Liu et al., 2011). Diese sollte theoretisch für 67% der gesamten Methanogenese verantwortlich sein, wenn Polysaccharide vollständig zu CO<sub>2</sub> und Methan abgebaut werden (Conrad, 1999; Conrad, 2005). Die restliche Methanproduktion wird der hydrogenotrophen Methanogenese zugeschrieben, bei der die Kohlenstoffisotopensignatur des produzierten Methans in untersuchten Umweltproben teilweise eine sehr starke Fraktionierung suggeriert. Die Bestimmung der Fraktionierungskoeffizienten in verschiedenen, methanogenen Seesedimenten ergab für die hydrogenotrophe Methanogenese Werte im Bereich von -57‰ bis -85‰ (Conrad et al., 2007; Conrad et al., 2010a; Conrad et al., 2011). Diese beobachteten Fraktionierungen sind interessanterweise erheblich stärker als die, welche in den Reinkulturen beobachtet wurden (siehe auch Tab. 6.1).

Ein möglicher Grund hierfür ist, dass unter gehemmten Bedingungen die methylo troph e Methanogenese stärker zur gesamten Methanproduktion beitragen könnte als bisher angenommen. Je nach Bodenart kann der Anteil der methylo troph en Methanogenese unter ungehemmten Bedingungen bis zu 10% betragen (Abb. 6.4). Da das zugesetzte Methylfluorid weder die Menge des produzierten Methans noch die Kohlenstoffisotopenfraktionierung während der methylo troph en Methanogenese beeinflusst (Abb. 6.5), ist es möglich, dass ihr Beitrag zur gesamten Methanproduktion die Kohlenstoffisotopie des gebildeten Methans zu niedrigeren Werten verschiebt. Aus der Hydrolyse von Pektin ohne

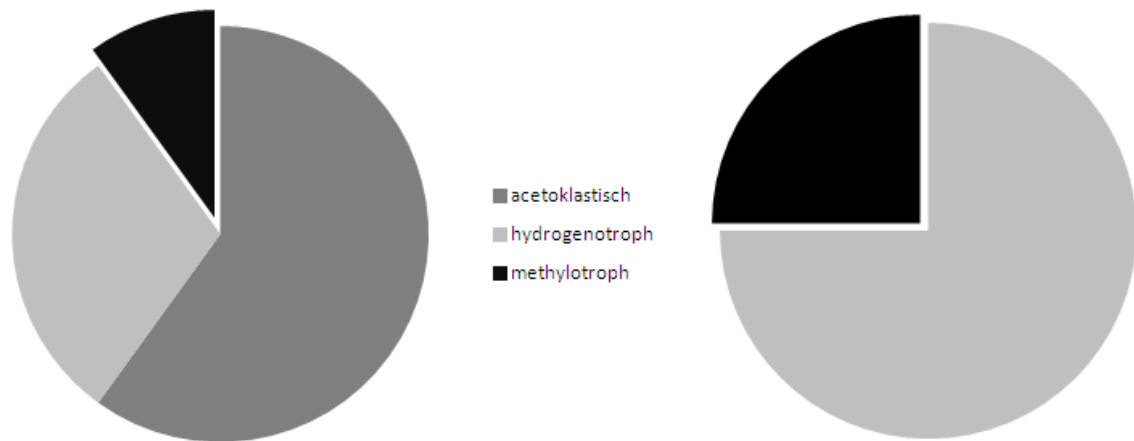


Abbildung 6.4: Hypothetische Anteile der verschiedenen Arten der Methanogenese an der Gesamtmethanproduktion in Umweltproben unter ungehemmten (links) und gehemmten (rechts) Bedingungen.

Kohlenstoffisotopendiskriminierung erhaltenes Methanol besitzt mit etwa -30‰ bis -25‰ ungefähr die gleiche Kohlenstoffisotopie wie organisches Material (Craig, 1953). Wenn Methyilotrophe aus diesem Methanol Methan produzieren, würde dieses eine Kohlenstoffisotopie von etwa -100‰ aufweisen. Wenn nun in der Gegenwart von Methylfluorid durch die Hemmung der acetoklastische Methanogenese der Anteil des methyilotroph erzeugten Methans auf 25% fast verdreifacht (Abb. 6.4) wird und das übrige Methan hydrogenotroph erzeugt wird, welches dann eine Kohlenstoffisotopie von etwa -70‰ aufweist (siehe auch Tab. 6.1), würde die daraus resultierende Kohlenstoffisotopie des gemessenen Methans bei ungefähr -80‰ liegen. Das hätte zur Folge, dass für die

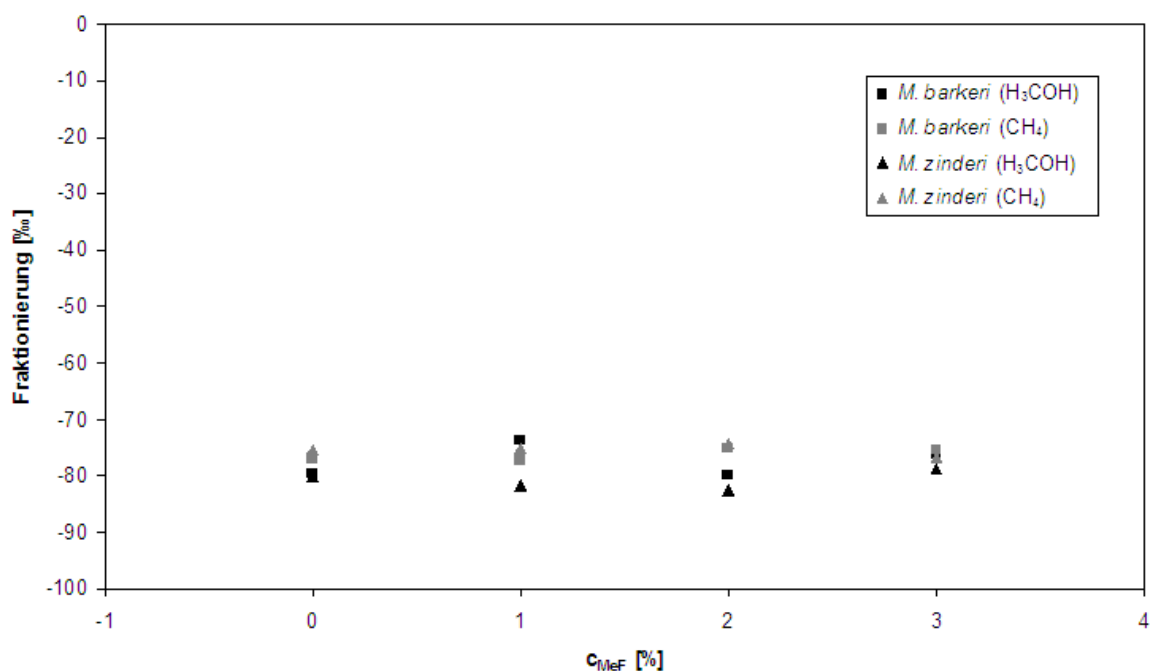


Abbildung 6.5: Grafische Auftragung der Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. barkeri* und *M. zinderi* bei 37°C in Abhängigkeit der MeF-Konzentration.

Gesamtfractionierung statt einem Fraktionierungskoeffizienten von -45‰ ein Fraktionierungskoeffizient von -55‰ angenommen würde.

Da aber bereits für einen Fraktionierungskoeffizienten von -75‰ das gesamte Methan durch methylo tro phe Methanogenese entstehen müsste, kann dies nicht als alleiniger Grund für die starken Fraktionierungen in den erwähnten Grundwassersedimenten in Frage kommen. Aber es zeigt trotzdem, dass in Zukunft bei der Bestimmung der Fraktionierungskoeffizienten in Umweltproben die methylo tro phe Methanogenese eine stärkere Beachtung finden muss.

## 6.4 Zusammenfassende Diskussion

Die Ergebnisse zeigten, dass der Fraktionierungskoeffizient im geschlossenen System wie im offenen System stark vom Substrat abhängig ist. Die drei untersuchten Arten der methylo tro phen methanogenen Archaeen zeigten für die methanogene Umwandlung von Methanol ähnliche Fraktionierungen und dass die dazugehörigen Fraktionierungskoeffizienten viel stärker sind als die, die für acetoklastische oder hydrogenotrophe Methanogenese erhaltenen wurden. Daher können sie, auch wenn der Beitrag der methylo tro phen Methanogenese zur gesamten Methanproduktion in der Umwelt begrenzt ist, dennoch erhebliche Auswirkungen auf die Kohlenstoffisotopensignatur produzierten Methans haben. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse auch, dass die Fraktionierungskoeffizienten in geschlossenen Systemen gegenüber den untersuchten äußeren Einflüssen sehr stabil sind. Sowohl Carbonatgehalt sowie pH-Wert des Mediums haben keinen gesteigerten Einfluss auf die ermittelten Werte sofern der Reaktionsumsatz hoch genug ist, um diese zuverlässig zu berechnen. Gleiches gilt auch für die Temperatur, die keinen Einfluss zeigte, welcher größer war als die vorhandenen messtechnischen Ungenauigkeiten. Da die Untersuchung von Umweltproben häufig in geschlossenen Systemen durchgeführt wird, bedeutet dies, dass beobachtete Änderungen der Gesamtfractionierung während der Methanogenese in Abhängigkeit von diesen Faktoren ihren alleinigen Grund darin haben, dass andere Stoffwechselwege bevorzugt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch Methylfluorid keinen Einfluss auf die Fraktionierung während der methylo tro phe Methanogenese hat. Somit kann diese auch in Gegenwart von Methylfluorid, während die acetoklastische Methanogenese gehemmt wird, einen Einfluss auf die Kohlenstoffisotopie des erzeugten Methans ausüben. Die Kohlenstoffisotopensignatur des Methans ist unter diesen Bedingungen also nicht nur von der hydrogenotrophen Methanogenese abhängig, sondern kann zusätzlich auch noch stärker als bisher angenommen von den methylo tro phen Methanogenen beeinflusst werden. Aufgrund des großen „Fraktionierungsfensters“ der hydrogenotrophen Methanogenese ist es allerdings schwierig die Anteile der methylo tro phen Methanogenese an der gesamten Methanbildung genau zu bestimmen, wenn man die Fraktionierungskoeffizienten der einzelnen vorkommenden bzw. aktiven Methanogenen nicht genau kennt.

## 7 Literatur

- Barnes, C., Sweeting, C. J., Jennings, S., Barry, J. T. und Polunin, N. V. C. (2007) Effect of temperature and ration size on carbon and nitrogen stable isotope trophic fractionation. *Funct. Ecol.* **21**(2): 356-362.
- Botz, R., Pokojski, H. D., Schmitt, M. und Thomm, M. (1996) Carbon isotope fractionation during bacterial methanogenesis by CO<sub>2</sub> reduction. *Org. Geochem.* **25**(3-4): 255-262.
- Brand, W. A. (1996) High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**(3): 225-235.
- Brock, T. B. und Madigan, M. T. (1991) *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- Canfield, D. E., Olesen, C. A. und Cox, R. P. (2006) Temperature and its control of isotope fractionation by a sulfate-reducing bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**(3): 548-561.
- Chin, K. J., Lukow, T. und Conrad, R. (1999) Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(6): 2341-2349.
- Conrad, R. (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**(3): 193-202.
- Conrad, R. (2005) Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal. *Org. Geochem.* **36**(5): 739-752.
- Conrad, R., Chan, O. C., Claus, P. und Casper, P. (2007) Characterization of methanogenic archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Limnol. Oceanogr.* **52**(4): 1393-1406.
- Conrad, R. und Claus, P. (2005) Contribution of methanol to the production of methane and its C-13-isotopic signature in anoxic rice field soil. *Biogeochemistry* **73**(2): 381-393.
- Conrad, R., Claus, P. und Casper, P. (2010a) Stable isotope fractionation during the methanogenic degradation of organic matter in the sediment of an acidic bog lake, Lake Grosse Fuchskuhle. *Limnol. Oceanogr.* **55**(5): 1932-1942.
- Conrad, R. und Klose, M. (1999) How specific is the inhibition by methyl fluoride of acetoclastic methanogenesis in anoxic rice field soil? *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**(1): 47-56.
- Conrad, R., Klose, M., Claus, P. und Enrich-Prast, A. (2010b) Methanogenic pathway, (13)C isotope fractionation, and archaeal community composition in the sediment of two clear-water lakes of Amazonia. *Limnol. Oceanogr.* **55**(2): 689-702.

- Conrad, R., Noll, M., Claus, P., Klose, M., Bastos, W. R. und Enrich-Prast, A. (2011) Stable carbon isotope discrimination and microbiology of methane formation in tropical anoxic lake sediments. *Biogeosciences* **8**(3): 795-814.
- Craig, H. (1953) The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* **3**(2-3): 53-92.
- de Vries, J. J. (2005) Volume I: Introduction - theory, methods, review. In *Environmental isotopes in the hydrological cycle: Principles and applications* (ed. W. G. Mook), International Atomic Energy Agency, Paris, France.
- Deppenmeier, U. (2004) The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**(1): 55-64.
- Deppenmeier, U., Lienard, T. und Gottschalk, G. (1999) Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett.* **457**(3): 291-297.
- Doerfert, S. N., Reichlen, M., Iyer, P., Wang, M. Y. und Ferry, J. G. (2009) *Methanolobus zinderi* sp. nov., a methylotrophic methanogen isolated from a deep subsurface coal seam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**(5): 1064-1069.
- Dreisbach, L. K., Blaser, M. B. und Conrad, R. (2012, zur Veröffentlichung eingereichtes Manuskript) The carbon isotope fractionation in the acetyl-CoA pathway of homoacetogenic bacteria does reflect their phylogenetic diversity.
- Elsner, M., Zwank, L., Hunkeler, D. und Schwarzenbach, R. P. (2005) A new concept linking observable stable isotope fractionation to transformation pathways of organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **39**(18): 6896-6916.
- Fey, A., Claus, P. und Conrad, R. (2004) Temporal change of  $^{13}\text{C}$ -isotope signatures and methanogenic pathways in rice field soil incubated anoxically at different temperatures. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**(2): 293-306.
- Frankenberg, C., Meirink, J. F., van Weele, M., Platt, U. und Wagner, T. (2005) Assessing methane emissions from global space-borne observations. *Science* **308**(5724): 1010-1014.
- Fuchs, G., Thauer, R., Ziegler, H. und Stichler, W. (1979) Carbon isotope fractionation by *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **120**(2): 135-139.
- Gelwicks, J. T., Risatti, J. B. und Hayes, J. M. (1989) Carbon isotope effects associated with autotrophic acetogenesis. *Org. Geochem.* **14**(4): 441-446.
- NASA Goddard Institute for Space Studies (GISS) (2012) GISS Surface Temperature Analysis: Analysis Graphs and Plots. [http://data.giss.nasa.gov/gistemp/graphs\\_v3/](http://data.giss.nasa.gov/gistemp/graphs_v3/) [Stand: 19.01.2012]

- Goevert, D. und Conrad, R. (2009) Effect of substrate concentration on carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *M. acetivorans* and in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(9): 2605-2612.
- Hansen, J., Ruedy, R., Sato, M., Imhoff, M., Lawrence, W., Easterling, D., Peterson, T. und Karl, T. (2001) A closer look at United States and global surface temperature change. *J. Geophys. Res.-Atmos.* **106**(D20): 23947-23963.
- Hayes, J. M. (1993) Factors controlling  $^{13}\text{C}$  contents of sedimentary organic compounds - Principles and evidence. *Mar. Geol.* **113**(1-2): 111-125.
- Hayes, J. M. (2002) Practice and principles of isotopic measurements in organic geochemistry. [http://www.gps.caltech.edu/classes/ge148c/Practice and Principles.pdf](http://www.gps.caltech.edu/classes/ge148c/Practice%20and%20Principles.pdf)
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2007) Zusammenfassung für politische Entscheidungsträger. In *Klimaänderung 2007: Wissenschaftliche Grundlagen. Beitrag der Arbeitsgruppe I zum Vierten Sachstandsbericht des Zwischenstaatlichen Ausschusses für Klimaänderung (IPCC)* (ed. S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor und H. L. Miller), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. Deutsche Übersetzung durch ProClim-, österreichisches Umweltbundesamt, deutsche IPCC-Koordinationsstelle, Bern/Wien/Berlin, 2007.
- Janssen, P. H. und Frenzel, P. (1997) Inhibition of methanogenesis by methyl fluoride: Studies of pure and defined mixed cultures of anaerobic bacteria and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(11): 4552-4557.
- Jiang, N., Wang, Y. F. und Dong, X. Z. (2010) Methanol as the primary methanogenic and acetogenic precursor in the Cold Zoige Wetland at Tibetan Plateau. *Microb. Ecol.* **60**(1): 206-213.
- Karakurt, I., Aydin, G. und Aydiner, K. (2012) Sources and mitigation of methane emissions by sectors: A critical review. *Renew. Energy* **39**(1): 40-48.
- King, G. M., Klug, M. J. und Lovley, D. R. (1983) Metabolism of acetate, methanol, and methylated amines in intertidal sediments of Lowes Cove, Maine. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(6): 1848-1853.
- Krummen, M., Hilker, A. W., Juchelka, D., Duhr, A., Schluter, H. J. und Pesch, R. (2004) A new concept for isotope ratio monitoring liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**(19): 2260-2266.
- Krzycki, J. A., Kenealy, W. R., Deniro, M. J. und Zeikus, J. G. (1987) Stable carbon isotope fractionation by *Methanosarcina barkeri* during methanogenesis from acetate, methanol, or carbon dioxide-hydrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(10): 2597-2599.



- Li, Q. B., Li, L. Y., Rejtar, T., Lessner, D. J., Karger, B. L. und Ferry, J. G. (2006) Electron transport in the pathway of acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J. Bacteriol.* **188**(2): 702-710.
- Liu, H., Wang, J., Wang, A. J. und Chen, J. A. (2011) Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**(5): 1333-1340.
- Londry, K. L., Dawson, K. G., Grover, H. D., Summons, R. E. und Bradley, A. S. (2008) Stable carbon isotope fractionation between substrates and products of *Methanosarcina barkeri*. *Org. Geochem.* **39**(5): 608-621.
- Loulergue, L., Schilt, A., Spahni, R., Masson-Delmotte, V., Blunier, T., Lemieux, B., Barnola, J. M., Raynaud, D., Stocker, T. F. und Chappellaz, J. (2008) Orbital and millennial-scale features of atmospheric CH<sub>4</sub> over the past 800,000 years. *Nature* **453**(7193): 383-386.
- Lovley, D. R. und Klug, M. J. (1983) Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(4): 1310-1315.
- Mariotti, A., Germon, J. C., Hubert, P., Kaiser, P., Letolle, R., Tardieux, A. und Tardieux, P. (1981) Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation - Some principles - Illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil* **62**(3): 413-430.
- Noll, M., Klose, M. und Conrad, R. (2010) Effect of temperature change on the composition of the bacterial and archaeal community potentially involved in the turnover of acetate and propionate in methanogenic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**(2): 215-225.
- Nusslein, B. und Conrad, R. (2000) Methane production in eutrophic Lake Plussee: Seasonal change, temperature effect and metabolic processes in the profundal sediment. *Arch. Hydrobiol.* **149**(4): 597-623.
- Oreskes, N. (2005) The scientific consensus on climate change (vol 306, pg 1686, 2004). *Science* **307**(5708): 355-355.
- Penning, H. (2006) *Fraktionierung stabiler Isotope durch anaerobe Bodenmikroorganismen*. Dissertation, Marburg.
- Penning, H., Plugge, C. M., Galand, P. E. und Conrad, R. (2005) Variation of carbon isotope fractionation in hydrogenotrophic methanogenic microbial cultures and environmental samples at different energy status. *Glob. Change Biol.* **11**(12): 2103-2113.
- Rosenfeld, W. D. und Silverman, S. R. (1959) Carbon isotope fractionation in bacterial production of methane. *Science* **130**(3389): 1658-1659.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**(2): 262-280.

- Schink, B. und Zeikus, J. G. (1980) Microbial methanol formation: A major end product of pectin metabolism. *Curr. Microbiol.* **4**(6): 387-389.
- Schink, B. und Zeikus, J. G. (1982) Microbial ecology of pectin decomposition in anoxic lake sediments. *J. Gen. Microbiol.* **128**(FEB): 393-404.
- Schönheit, P., Moll, J. und Thauer, R. K. (1979) Nickel, cobalt, and molybdenum requirement for growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **123**(1): 105-107.
- Schönheit, P., Moll, J. und Thauer, R. K. (1980) Growth parameters ( $K_S$ ,  $\mu_{max}$ ,  $Y_S$ ) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **127**(1): 59-65.
- Shindell, D. T., Faluvegi, G., Koch, D. M., Schmidt, G. A., Unger, N. und Bauer, S. E. (2009) Improved attribution of climate forcing to emissions. *Science* **326**(5953): 716-718.
- Thauer, R. K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Thauer, R. K., Kaufer, B. und Fuchs, G. (1975) The active species of 'CO<sub>2</sub>' utilized by reduced ferredoxin: CO<sub>2</sub> oxidoreductase from *Clostridium pasteurianum*. *Eur. J. Biochem.* **55**(1): 111-117.
- Troughton, J. H. und Card, K. A. (1975) Temperature effects on the carbon-isotope ratio of C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and crassulacean-acid-metabolism (CAM) plants. *Planta* **123**(2): 185-190.
- Valentine, D. L., Chidthaisong, A., Rice, A., Reeburgh, W. S. und Tyler, S. C. (2004) Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**(7): 1571-1590.
- Vorholt, J. A. und Thauer, R. K. (1997) The active species of 'CO<sub>2</sub>' utilized by formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* **248**(3): 919-924.
- Welander, P. V. und Metcalf, W. W. (2005) Loss of the mtr operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**(30): 10664-10669.
- Zeikus, J. G. und Wolfe, R. S. (1972) *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **109**(2): 707-713.

---

## Curriculum Vitae

---

### Persönliche Daten

---

Name	Jörn Sebastian Penger
Geburtsdatum und -ort	15. August 1982 in Essen
Nationalität	deutsch

---

### Wissenschaftlicher Werdegang

---

01/2009 - heute	Doktorand am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Marburg) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Conrad (Biogeochemie)
10/2002 - 09/2008	Studium der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit Vertiefung in Bioorganischer Chemie und Biochemie Titel der Diplomarbeit: „Versuche zur <i>S</i> -Adenosyl-Methionin-Synthetase“ (Prof. Dr. Jörg Pietruszka, Institut für Bioorganische Chemie im Forschungszentrum Jülich; Dr. Susanne Wilhelm und Dr. Frank Rosenau, Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich)

---

### Wehrdienst

---

09/2001 - 05/2002	Grundwehrdienst, Gerolstein, Munitions- und Betriebsstoffwart
-------------------	---

---

### Schulische Ausbildung

---

08/1992 - 06/2001	Gymnasium Korschenbroich
02/1991 - 07/1992	Gemeinschaftsgrundschule in Korschenbroich-Glehn
08/1988 - 02/1991	Eichendorffgrundschule in Essen-Schönebeck

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die finanzielle Unterstützung bedanken. Ebenfalls möchte ich nicht unerwähnt lassen, dass er mir stets allen forschersichen Freiraum gewährt hat, sich aber stets für meine Arbeit interessiert und diese durch Diskussionen und wertvolle Anregungen unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad und Herrn Prof. Dr. Rudolf K. Thauer möchte ich herzlich für die Erstellung der Gutachten für diese Arbeit danken.

Ich danke auch allen meinen Kolleginnen und Kollegen in der Abteilung Biogeochemie des Max-Planck-Instituts für terrestrische Mikrobiologie, die eine hervorragende Arbeitsatmosphäre geschaffen haben, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Hervorzuheben ist hier die großartige Unterstützung und das Engagement von Herrn Dr. Martin Blaser in allen Teilbereichen dieser Arbeit. Ebenfalls danke ich Herrn Peter Claus und Frau Melanie Klose für ihre technische Unterstützung bei allen während der Arbeit aufgetretenen Problemen.

Mein besonderer Dank gebührt natürlich auch meiner Mutter, die mir das Studium ermöglicht hat und mich stets von nah oder fern in jeglicher Angelegenheit unterstützt hat und dies hoffentlich auch weiterhin tun wird.

Ebenfalls danke ich meiner Freundin Angelika dafür, dass sie stets meine Launen ertragen und mich mit ihrer Zuneigung unterstützt hat.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

**„Einflüsse auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung in methanogenen Systemen“**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 3. Juli 2012

Jörn Sebastian Penger

## Zusammenstellung der Messwerte

*Tabelle M.1:* Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. marburgensis* bei unterschiedlichen Temperaturen (carbonatfreies Medium).

*Methanothermobacter marburgensis* bei 65°C (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-36,284	0,000		-36,815	0,000		-36,881
12	0,111	-68,511	-32,242	0,042	-67,261	-35,491		-68,029	
24	0,195	-66,835	-28,878	0,045	-65,528	-35,467	0,031	-66,783	-35,917
36	0,281	-65,407	-24,886	0,060	-65,519	-34,994	0,034	-64,859	-35,905
48	0,356	-64,137	-20,901	0,105	-65,152	-33,489	0,016	-66,758	-36,402
60	0,421	-63,119	-16,757	0,188	-65,889	-30,103	0,020	-65,204	-36,294
72	0,520	-60,581	-9,988	0,310	-63,939	-24,624	0,093	-65,163	-33,998
84	0,580	-58,918	-4,981	0,403	-62,679	-19,391	0,184	-67,328	-30,034
108	0,674	-56,209	4,898	0,546	-59,816	-9,098	0,427	-62,628	-17,676
132	0,648	-65,526	17,470	0,674	-55,799	2,495	0,580	-58,979	-6,385
156	0,790	-49,452	13,343	0,748	-53,219	11,875	0,696	-57,250	9,765
204	0,882	-46,989	43,628	0,844	-48,157	24,498	0,804	-53,001	29,372
252	0,898	-45,168	42,166	0,906	-45,181	44,240	0,854	-48,853	33,157
324	0,923	-43,483	49,911	0,943	-42,881	63,616	0,912	-45,711	54,880
372	0,947	-42,229	69,439	0,960	-41,320	70,916	0,934	-43,963	63,378
420	0,957	-41,333	75,298	0,965	-40,882	74,146	0,945	-43,112	70,811
492	0,952	-40,618	50,609	0,971	-40,075	73,160	0,953	-42,078	67,774
540	0,958	-40,733	66,021	0,970	-39,864	63,349	0,955	-41,960	69,786
$\epsilon$ [‰]									
-35,5 $\pm$ 2,1 -32,8 $\pm$ 1,4 -30,5 $\pm$ 0,9 -33,0 $\pm$ 0,5 -28,3 $\pm$ 1,4 -36,1 $\pm$ 0,6									

*Methanothermobacter marburgensis* bei 37°C (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-36,596
12	0,037	-62,609	-35,610
24	0,068	-63,614	-34,640
36	0,094	-63,001	-33,867
48	0,079	-65,025	-34,153
60	0,111	-64,594	-33,093
72	0,153	-64,473	-31,570
84	0,171	-64,879	-30,756
108	0,200	-64,926	-29,496
132	0,268	-64,402	-26,408
156	0,303	-64,363	-24,497
204	0,377	-62,772	-20,774
252	0,438	-61,818	-16,921
324	0,499	-60,471	-12,774
372	0,547	-59,175	-9,362
420	0,578	-58,220	-7,000
492	0,635	-56,725	-1,571
540	0,654	-55,628	-0,610
660	0,754	-52,819	13,254
732	0,825	-50,653	29,460
828	0,867	-48,297	39,594
900	0,903	-46,478	55,855
996	0,919	-45,630	65,361
1064	0,918	-45,233	60,590
1184	0,933	-44,124	68,666
1236	0,930	-44,048	62,068
1332	0,943	-43,391	74,848
1404	0,939	-43,563	70,416
$\epsilon$ [‰]			
-32,0 $\pm$ 0,4 -36,7 $\pm$ 0,5			

*Methanothermobacter marburgensis* bei 45°C (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-36,594	0,000		-36,418	0,000		-36,496
12	0,076	-66,570	-34,133	0,078	-68,355	-33,707	0,074	-68,216	-33,962
24	0,119	-66,585	-32,552	0,150	-67,201	-31,000	0,135	-67,862	-31,608
36	0,157	-66,147	-31,101	0,181	-67,335	-29,604	0,174	-67,108	-30,069
48	0,196	-66,519	-29,289	0,231	-66,959	-27,258	0,202	-67,496	-28,654

60	0,255	-65,647	-26,635	0,277	-66,287	-24,951	0,258	-66,374	-26,091
72	0,331	-64,368	-22,835	0,345	-64,118	-21,812	0,336	-64,486	-22,312
84	0,359	-64,393	-21,048	0,390	-63,781	-18,929	0,375	-64,268	-19,856
108	0,453	-61,952	-15,608	0,492	-60,769	-12,817	0,450	-61,756	-15,855
132	0,507	-61,059	-11,470	0,562	-59,364	-6,979	0,533	-60,406	-9,243
156	0,561	-59,206	-7,755	0,615	-57,731	-2,369	0,602	-58,241	-3,591
204	0,648	-56,581	0,230	0,715	-54,236	8,387	0,708	-54,545	7,231
252	0,715	-54,361	7,920	0,778	-51,872	17,669	0,783	-51,577	18,077
324	0,789	-51,347	18,523	0,840	-49,515	32,194	0,834	-49,564	29,103
372	0,812	-51,135	26,025	0,875	-47,388	40,079	0,880	-47,049	41,004
420	0,848	-48,745	31,291	0,903	-45,593	48,634	0,894	-46,164	45,016
492	0,887	-46,655	42,346	0,929	-44,045	62,867	0,933	-43,564	62,323
ε [‰]									
-32,6 ± 0,6 -36,5 ± 0,3 -34,0 ± 0,3 -37,3 ± 0,2 -34,1 ± 0,3 -36,6 ± 0,1									

*Methanothermobacter marburgensis* bei 55°C (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-36,488	0,000		-36,220	0,000		-36,333
12	0,028	-67,125	-35,603	0,004	-63,327	-36,109	0,016	-64,619	-35,862
24	0,033	-66,396	-35,454	0,000	-53,666	-36,227	0,029	-66,119	-35,455
36	0,054	-65,421	-34,834			-35,716	0,127	-66,874	-31,889
48	0,110	-66,212	-32,817	-0,003	-63,428	-36,306	0,244	-67,670	-26,209
60	0,223	-65,561	-28,142	-0,007	-61,185	-36,387	0,339	-65,683	-21,298
72	0,410	-63,377	-17,786	0,024	-63,300	-35,540	0,473	-62,208	-13,148
84	0,527	-61,307	-8,886	0,024	-61,967	-35,587	0,533	-60,642	-8,572
108	0,661	-57,378	4,154	0,082	-45,042	-35,435	0,685	-56,671	7,808
132	0,779	-52,176	18,925	0,064	-55,876	-34,883	0,750	-55,540	21,344
156	0,847	-49,762	36,956	0,222	-42,472	-34,439			36,027
204	0,902	-45,540	46,945	-0,136	-38,677	-36,515	0,923	-43,323	47,425
252	0,932	-43,235	55,964	0,160	-41,672	-35,179	0,915	-41,902	23,543
324	0,941	-43,062	68,060			-34,910	0,911	-41,226	13,619
372	0,955	-41,499	68,912			-34,413	0,942	-39,895	21,736
420	0,954	-41,427	65,161			-34,795	0,935	-39,668	11,758
492	0,956	-41,365	69,954			-34,874	0,951	-39,078	17,099
540	0,952	-41,229	58,037			-35,200	0,964	-40,004	60,701
ε [‰]									
-30,8 ± 1,1 -35,6 ± 0,6 -30,7 ± 1,6 -37,9 ± 0,5									

*Methanothermobacter marburgensis* bei 60°C (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-37,234	0,000		-36,710	0,000		-36,386
12									-36,608
24							0,041	-48,372	-35,875
36							0,004	-58,436	-36,295
48			-37,431			-36,941			-36,754
60							0,004	-66,879	-36,278
72							0,033	-61,303	-35,530
84							0,044	-63,471	-35,149
108							0,104	-69,699	-32,539
120	0,014	-50,113	-37,055			-36,890			
132							0,248	-68,333	-25,863
156							0,382	-64,793	-18,801
168			-37,106			-36,781			
204							0,616	-58,241	-1,303
252							0,724	-54,589	11,266
288			-37,125	0,058	-67,175	-34,835			
324							0,812	-50,441	24,330
336	0,153	-69,621	-31,373	0,875	-45,970	28,216			
360	0,306	-65,699	-24,693	0,898	-44,694	33,748			
372							0,874	-47,520	40,835
384	0,435	-64,131	-16,489	0,919	-43,418	39,280			
420							0,904	-44,886	44,046
456	0,737	-54,814	12,086	0,955	-41,033	55,735			
492							0,928	-42,796	45,933
504	0,850	-49,746	33,614	0,974	-39,746	79,060			
540							0,918	-41,743	23,763
552	0,923	-45,174	58,434	0,975	-39,824	85,559			
720		-38,342		0,985	-38,660	92,246			

864	-37,316	0,985	-38,440	80,181					
$\epsilon$ [‰]	-34,1 ± 0,9	-37,4 ± 0,2	-31,5 ± 0,2	-30,8 ± 0,6	-36,6 ± 0,8	-37,1 ± 0,2			
<i>Methanothermobacter marburgensis</i> bei 68°C (carbonatfreies Medium)									
Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-51,419	-37,368	0,000		-36,987	0,000		-37,239
48			-37,305			-37,442			-37,334
120	0,052	-47,883	-36,797			-37,165			-36,991
168			-37,196			-37,316			-37,353
240	0,116	-59,688	-34,429			-37,104	0,149	-54,013	-34,293
336	0,545	-60,442	-9,739	0,003	-58,194	-36,916	0,695	-54,400	1,880
384	0,712	-55,202	6,684	0,017	-40,344	-36,930	0,820	-49,504	18,500
456	0,837	-49,940	26,995	0,019	-44,068	-36,848	0,884	-45,839	28,096
504	0,890	-47,253	42,514	0,565	-36,897	-37,104	0,910	-44,353	34,920
552	0,930	-44,814	61,438	0,007	-25,905	-37,065	0,940	-43,619	63,451
648	0,964	-42,000	86,876	-0,014	-25,130	-36,826	0,945	-41,824	40,988
720	0,970	-40,911	78,415	-0,012	-27,538	-36,872	0,942	-40,953	23,393
864	0,970	-40,689	70,128			-36,595	0,956	-40,690	38,491
$\epsilon$ [‰]	-35,4 ± 0,6	-37,4 ± 0,4					-35,9 ± 2,2	-33,4 ± 2,0	

Tabelle M.2: Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. marburgensis* bei 65°C (carbonathaltiges Medium).

*Methanothermobacter marburgensis* bei 65°C (carbonathaltiges Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-21,562
48	0,063	-55,933	-19,234
144	0,409	-49,185	-2,475
216	0,437	-49,125	-0,165
312	0,441	-48,819	-0,049
$\epsilon$ [‰]	-30,9 ± 1,5	-37,0 ± 0,4	

Tabelle M.3: Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. thermautotrophicus* bei unterschiedlichen Temperaturen (carbonathaltiges Medium).

*Methanothermobacter thermautotrophicus* bei 65°C (carbonathaltiges Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-19,850	0,000		-21,068
24	0,144	-48,087	-15,107	0,139	-47,727	-16,753
48	0,224	-48,474	-11,584	0,223	-49,391	-12,931
72	0,289	-48,797	-8,081	0,277	-50,200	-9,925
96	0,342	-48,546	-4,920	0,329	-49,941	-6,925
120	0,355	-48,447	-4,102	0,349	-49,843	-5,646
144	0,365	-48,489	-3,405	0,373	-49,689	-4,061
168	0,383	-48,119	-2,333	0,391	-49,646	-2,725
192	0,379	-48,337	-2,494	0,389	-50,669	-2,204
216	0,382	-48,327	-2,217	0,409	-49,478	-1,438
240	0,385	-48,377	-1,988	0,415	-49,633	-0,794
312	0,389	-48,196	-1,832	0,431	-49,313	0,362
360	0,382	-47,979	-2,435	0,429	-49,228	0,081
$\epsilon$ [‰]	-9,7 ± 2,2	-37,6 ± 0,6		-7,8 ± 3,7	-39,3 ± 0,9	

*Methanothermobacter thermautotrophicus* bei 40°C (carbonathaltiges Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-43,532	-21,322	0,000	-43,885	-21,113
24	0,024	-47,717	-20,660	0,034	-50,075	-20,081
48	0,054	-43,532	-20,054	0,067	-42,909	-19,558
72	0,094	-42,567	-19,105	0,095	-43,459	-18,756
96	0,145	-43,742	-17,509	0,139	-44,783	-17,291
120	0,168	-44,670	-16,614	0,160	-46,191	-16,341
144	0,195	-45,888	-15,381	0,191	-47,144	-14,986



168	0,228	-46,449	-13,899	0,217	-48,488	-13,542
192	0,242	-47,319	-13,003	0,243	-48,214	-12,433
216	0,268	-47,937	-11,595	0,264	-48,767	-11,216
240	0,264	-48,385	-11,613	0,277	-48,891	-10,479
312	0,338	-49,402	-7,000	0,339	-49,085	-6,745
360	0,353	-49,088	-6,145	0,358	-48,868	-5,639
408	0,341	-50,509	-6,248	0,338	-49,971	-6,376

$\epsilon$  [‰]  $-36,0 \pm 1,5$   $-36,2 \pm 1,1$

*Methanothermobacter thermautotrophicus* bei 50°C (carbonathaltiges Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-20,784	0,000		-20,988
24	0,040	-58,215	-19,214	0,042	-56,412	-19,427
48	0,012	-50,252	-20,411	0,004	-57,749	-20,856
72	0,048	-55,277	-19,030	0,045	-57,025	-19,284
96	0,106	-48,044	-17,552	0,093	-46,297	-18,399
120	0,151	-48,294	-15,900	0,135	-46,753	-16,951
144	0,209	-48,526	-13,433	0,202	-47,579	-14,245
168	0,247	-48,887	-11,559	0,243	-47,894	-12,363
192	0,278	-48,604	-10,074	0,277	-47,802	-10,712
216	0,329	-47,823	-7,543	0,321	-47,216	-8,574
288	0,417	-47,255	-1,871	0,397	-46,440	-4,209
336	0,421	-46,706	-1,925	0,422	-45,615	-3,042

$\epsilon$  [‰]  $-34,5 \pm 0,6$   $-32,8 \pm 0,6$

*Methanothermobacter thermautotrophicus* bei 55°C (carbonathaltiges Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-21,395	0,000		-20,969
24	0,047	-59,082	-19,540	0,051	-57,694	-18,998
48	0,033	-49,734	-20,443	0,027	-48,874	-20,180
72	0,167	-50,088	-15,653	0,144	-48,526	-16,338
96	0,229	-50,215	-12,850	0,216	-48,570	-13,364
120	0,274	-49,758	-10,683	0,262	-48,259	-11,302
144	0,317	-49,062	-8,545	0,302	-47,934	-9,309
168	0,350	-48,762	-6,662	0,335	-47,381	-7,648
192	0,370	-48,624	-5,405	0,355	-47,398	-6,397
216	0,392	-48,176	-4,159	0,374	-46,946	-5,418
288	0,437	-47,455	-1,179	0,418	-46,237	-2,807
336	0,440	-47,341	-0,989	0,430	-45,668	-2,300

$\epsilon$  [‰]  $-35,1 \pm 0,4$   $-33,4 \pm 0,4$

*Methanothermobacter thermautotrophicus* bei 60°C (carbonathaltiges Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-49,526	-19,789	0,000		-21,413
24	0,127	-45,166	-16,091	0,152	-49,825	-16,327
48	0,170	-46,562	-14,323	0,213	-49,989	-13,694
72	0,205	-47,241	-12,711	0,259	-49,875	-11,469
96	0,285	-48,288	-8,408	0,335	-49,604	-7,198
120	0,297	-48,457	-7,687	0,365	-49,200	-5,447
144	0,322	-47,889	-6,416	0,380	-49,173	-4,387
168	0,338	-47,961	-5,426	0,400	-48,603	-3,274
192	0,349	-48,053	-4,619	0,415	-48,577	-2,150
216	0,360	-48,035	-3,929	0,422	-48,647	-1,517
240	0,363	-48,308	-3,531	0,427	-48,769	-1,051
312	0,377	-48,237	-2,607	0,441	-48,373	-0,139
360	0,371	-48,219	-2,999	0,436	-48,279	-0,657

$\epsilon$  [‰]  $-37,6 \pm 0,9$   $-37,4 \pm 0,6$

*Methanothermobacter thermautotrophicus* bei 68°C (carbonathaltiges Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-20,744	0,000		-21,110
24	0,152	-43,788	-16,610	0,156	-44,009	-16,882
48	0,249	-47,889	-11,725	0,263	-48,141	-11,476
72	0,324	-48,441	-7,492	0,333	-48,915	-7,202
96	0,371	-48,271	-4,502	0,389	-48,491	-3,688
120	0,386	-48,455	-3,291	0,403	-48,583	-2,575
144	0,406	-47,987	-2,122	0,422	-48,291	-1,225

168	0,417	-47,888	-1,364	0,436	-47,934	-0,359
192	0,417	-48,225	-1,069	0,437	-48,048	-0,164
216	0,420	-48,114	-0,912	0,440	-48,189	0,151
240	0,438	-48,086	0,523	0,442	-48,264	0,361
312	0,428	-48,097	-0,295	0,448	-47,878	0,619
360	0,427	-47,829	-0,532	0,444	-48,003	0,332
$\epsilon$ [‰]		-38,3 ± 0,9		-38,4 ± 0,9		

Tabelle M.4: Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. acetivorans* bei unterschiedlichen Temperaturen.

*Methanosarcina acetivorans* bei 37°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-19,832	-37,722	-25,845	0,000	-31,274	-41,326	-25,759	0,000	-11,308	-38,011	-25,675
24	0,034	-17,717	-38,432	-24,497	0,215	-55,320	-37,499	-24,696	-0,040	-45,598	-38,300	-24,521
36	0,010	-18,475	-37,926	-24,439	0,105	-69,448	-38,028	-24,658	-0,024	-76,746	-38,905	-24,484
48	0,058	-20,629	-38,779	-24,208	0,061	-81,176	-38,733	-24,442	-0,010	-97,676	-38,630	-24,450
60	0,080	-23,584	-38,952	-24,294	0,059	-91,937	-38,129	-24,839	0,009	-106,822	-37,417	-25,347
72	0,154	-30,156	-39,100	-24,405	0,051	-101,076	-38,096	-25,187	0,034	-109,773	-35,517	-27,043
80	0,284	-35,658	-38,541	-24,466	0,064	-104,925	-36,976	-25,737	0,081	-108,429	-31,789	-29,196
88	-0,253	-44,951	-39,180	-24,234	0,078	-107,813	-35,673	-26,827	0,179	-105,923	-23,154	-32,629
96	-0,055	-58,460	-38,796	-24,046	0,140	-108,190	-30,444	-29,773	0,366	-97,485	-3,740	-35,911
104	-0,022	-72,725	-38,475	-23,460	0,238	-104,865	-21,489	-33,209	0,525	-89,963	19,487	-35,277
112	-0,028	-84,634	-39,015	-23,342	0,404	-96,919	-3,579	-35,676	0,686	-79,428	52,440	-31,819
120	0,006	-97,315	-37,371	-24,046	0,587	-87,307	24,093	-34,832	0,814	-69,006	97,530	-27,449
128	0,017	-100,360	-36,612	-24,166	0,698	-79,631	47,334	-32,502	0,887	-60,813	140,195	-23,721
136	0,029	-104,488	-35,708	-25,151	0,796	-69,287	67,701	-27,962		-47,033		-15,469
144	0,066	-106,378	-32,848	-26,877		-61,961		-23,644		-46,585		-15,232
152	0,128	-105,929	-27,683	-30,087		-54,024		-19,125		-46,054		-15,119
168	0,529	-90,224	21,243	-34,724		-47,471		-15,129		-46,684		-15,213
180	0,948	-56,040	296,050	-16,710		-46,904		-14,964		-45,818		-14,940
192		-46,024		-11,246		-46,962		-15,076		-46,407		-15,330
216		-46,450		-11,064		-47,043		-14,862		-46,440		-15,222
1,000		-37,722			1,000	-41,326			1,000	-38,011		
$\epsilon$ [‰]		-69,5 ± 3,8 -78,3 ± 0,8		-73,0 ± 1,2 -70,8 ± 1,4		-72,5 ± 1,3 -77,9 ± 0,4						

*Methanosarcina acetivorans* bei 25°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-45,764	-53,275	-21,668	0,000	-45,873	-53,634	-21,937	0,000	-44,920	-53,829	-21,716
360	0,249	-98,791	-38,211	-22,105	0,215	-113,025	-37,340	-23,032	0,297	-90,692	-38,275	-22,189
408	0,222	-112,501	-36,362	-23,816	0,255	-113,957	-32,988	-26,454		-107,315		-22,800
480	0,456	-103,827	-10,831	-34,286	0,605	-95,445	10,391	-35,906	0,401	-105,426	-19,271	-32,708
504	0,699	-94,872	43,410	-36,210	0,657	-89,705	15,338	-34,371	0,556	-99,282	3,050	-36,528
528	0,775	-83,748	51,899	-32,439	0,883	-73,368	95,150	-27,103	0,722	-87,540	33,820	-34,013
552	0,896	-71,568	104,177	-25,157	0,991	-56,021	198,735	-16,490	0,841	-77,154	69,839	-28,728
576	0,995	-54,632	234,222	-12,985		-47,357		-7,399	0,931	-67,200	126,722	-21,817
648		-46,617		-7,177		-46,569		-7,214		-39,971		-5,111
1,000		-53,275			1,000	-53,634			1,000	-53,829		
$\epsilon$ [‰]		-69,4 ± 3,2 -70,2 ± 4,3		-69,4 ± 1,7 -69,4 ± 2,4		-68,5 ± 1,1 -67,0 ± 0,7						

*Methanosarcina acetivorans* bei 30°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-45,149	-56,511	-21,717	0,000	-45,951	-50,293	-21,979	0,000	-47,279	-47,243	-21,796
24	-1,359	-49,117	-52,251	-21,387		-50,563		-21,597	1,094	-49,133	-69,234	-21,524
48	-0,466	-50,486	-54,597	-21,259		-55,926		-21,516	1,283	-51,828	-68,034	-21,397
144	0,286	-92,197	-42,226	-21,598	0,088	-109,557	-44,570	-22,399	-0,008	-70,070	-47,435	-21,302
168	0,058	-110,145	-53,233	-23,300	0,153	-112,937	-38,939	-25,228	-0,103	-97,471	-51,921	-21,340
192	0,459	-109,454	-11,513	-29,348	0,308	-104,409	-26,159	-33,640	0,122	-103,389	-39,412	-21,938
216	0,617	-96,092	7,265	-34,781	0,758	-82,464	50,745	-31,512	0,232	-85,640	-35,619	-27,196
240	0,805	-83,368	54,152	-31,330	1,019	-48,317	55,183	-9,067	0,242	-96,926	-31,376	-23,769
264	0,954	-65,522	128,441	-20,913		-46,196		-7,804	0,529	-80,897	-9,420	-26,608
312		-46,147		-6,324		-45,662		-7,389	0,969	-55,138	198,764	-16,287
336		-46,701		-6,373		-45,844		-7,338		-45,727		-8,464

360	-46,280	-6,524	-44,943	-7,156	-45,021	-8,455
1,000	-56,511		1,000	-50,293	1,000	-47,243
$\epsilon$ [‰]	-71,7 $\pm$ 3,1	-67,5 $\pm$ 2,2	-66,7 $\pm$ 2,3	-72,0 $\pm$ 1,3	-54,1 $\pm$ 4,0	-73,6 $\pm$ 3,8

Tabelle M.5: Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. barkeri* bei unterschiedlichen Temperaturen.

*Methanosarcina barkeri* bei 37°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-54,091	-38,345	-28,065	0,000	-57,726	-38,480	-28,674	0,000	-57,438	-38,336	-28,809
24	0,007	-52,589	-38,241	-27,871	-0,001	-54,599	-38,489	-28,068	-0,002	-53,176	-38,363	-28,209
96	-0,015	-53,277	-38,569	-27,912	-0,014	-54,023	-38,690	-27,913	-0,032	-53,763	-38,817	-28,048
192	-0,005	-66,100	-38,473	-27,929	-0,004	-86,610	-38,680	-28,110	-0,006	-76,836	-38,573	-28,253
216	-0,001	-94,074	-38,397	-28,086	0,005	-108,007	-38,105	-28,571	-0,002	-102,528	-38,441	-28,561
240	0,014	-111,295	-37,298	-29,682	0,030	-113,369	-36,136	-30,811	0,027	-112,787	-36,307	-30,674
264	0,080	-112,091	-31,909	-34,437	0,118	-110,319	-28,829	-36,330	0,111	-110,453	-29,339	-36,325
288	0,382	-97,112	-2,052	-36,157	0,478	-92,030	10,527	-32,818	0,437	-92,677	3,875	-35,506
312	0,710	-71,942	43,834	-16,205	0,839	-62,093	84,650	-7,477	0,726	-74,067	56,451	-20,571
336		-51,032		6,915		-50,745		6,389	0,868	-62,628	121,560	1,807
360		-50,595		8,241		-50,655		6,631		-49,407		5,031
1,000		-38,345			1,000	-38,480			1,000	-38,336		
$\epsilon$ [‰]		-76,1 $\pm$ 3,2	-75,4 $\pm$ 0,2			-77,3 $\pm$ 1,8	-75,4 $\pm$ 0,2			-75,4 $\pm$ 1,4	-73,1 $\pm$ 0,2	

*Methanosarcina barkeri* bei 25°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-56,276	-38,566	-28,932	0,000	-55,565	-38,473	-28,876	0,000	-53,211	-38,541	-28,906
24	-0,008	-54,005	-38,686	-28,734	-0,008	-53,459	-38,592	-28,833	0,001	-53,053	-38,530	-28,770
96	-0,008	-53,789	-38,681	-28,456	0,002	-53,848	-38,440	-28,651	-0,004	-52,497	-38,597	-28,686
288	-0,003	-59,648	-38,635	-28,638	-0,017	-54,246	-38,740	-28,666	-0,001	-53,359	-38,555	-28,707
336	-0,002	-63,969	-38,605	-28,535	0,005	-60,975	-38,361	-28,555	0,007	-57,081	-38,413	-28,691
384	-0,003	-69,064	-38,659	-28,539	-0,003	-61,376	-38,532	-28,763	-0,003	-56,271	-38,589	-28,589
408	-0,006	-74,188	-38,765	-28,687	0,001	-67,643	-38,451	-28,795	0,001	-59,005	-38,523	-28,680
432	0,003	-84,663	-38,445	-28,545	-0,004	-74,858	-38,613	-28,588	-0,005	-63,045	-38,671	-28,456
504	0,010	-114,564	-37,790	-29,464	0,006	-108,468	-38,027	-29,105	0,001	-93,857	-38,469	-28,922
528	0,019	-117,878	-37,069	-30,293	0,010	-114,899	-37,691	-29,462	0,004	-105,417	-38,268	-29,229
552	0,037	-118,796	-35,496	-32,017	0,018	-117,731	-37,024	-30,353	0,012	-112,179	-37,632	-29,853
576	0,076	-117,636	-32,101	-35,139	0,039	-118,473	-35,223	-32,227	0,024	-116,456	-36,636	-31,250
600	0,134	-115,186	-26,760	-38,387	0,070	-117,899	-32,449	-34,541	0,049	-117,319	-34,474	-33,003
624	0,247	-109,040	-15,439	-41,929	0,156	-114,454	-24,427	-38,998	0,112	-115,587	-28,782	-37,436
648	0,322	-105,727	-6,709	-41,090	0,257	-108,710	-14,150	-40,229	0,199	-110,245	-20,722	-39,659
672	0,411	-101,100	5,119	-39,783	0,395	-101,929	2,878	-38,849	0,335	-104,387	-5,440	-39,667
696	0,494	-96,978	18,355	-38,742	0,519	-94,932	22,530	-36,473	0,463	-98,288	13,013	-38,075
720	0,555	-93,384	29,672	-36,360	0,610	-88,948	40,630	-32,563	0,567	-91,666	31,018	-34,787
768	0,711	-81,544	67,159	-28,289	0,840	-66,917	110,537	-15,557	0,817	-69,726	100,935	-18,704
792	0,833	-67,023	103,048	-16,999	0,921	-53,937	142,185	-2,897	0,931	-53,308	159,581	-3,124
816	0,874	-65,133	146,484	-13,831		-51,917		-0,557	0,946	-50,742	173,618	-0,225
840		-57,407		-6,524		-51,177		-0,138		-51,197		-0,539
864		-52,847		1,979		-51,028		0,639		-50,809		0,007
1,000		-38,566			1,000	-38,473			1,000	-38,541		
$\epsilon$ [‰]		-82,0 $\pm$ 0,9	-81,0 $\pm$ 1,4			-83,2 $\pm$ 0,9	-81,7 $\pm$ 0,6			-82,1 $\pm$ 0,9	-75,6 $\pm$ 2,0	

*Methanosarcina barkeri* bei 30°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-54,365	-38,421	-28,486	0,000	-52,383	-38,427	-28,781	0,000	-54,643	-38,519	-28,869
24	0,005	-54,247	-38,345	-28,790	-0,004	-52,136	-38,486	-28,652	-0,013	-53,924	-38,722	-28,873
96	-0,012	-53,407	-38,593	-28,393	-0,008	-52,332	-38,535	-28,445	0,006	-54,276	-38,416	-28,518
216	-0,008	-58,667	-38,585	-28,409	-0,006	-56,756	-38,539	-28,540	-0,010	-65,871	-38,799	-28,596
240	-0,011	-67,664	-38,726	-28,575	-0,009	-65,721	-38,671	-28,803	0,000	-80,447	-38,529	-28,835
264	-0,004	-80,017	-38,601	-28,441	0,003	-80,615	-38,288	-28,546	0,005	-97,462	-38,231	-28,628
288	-0,002	-103,528	-38,580	-28,803	0,010	-103,395	-37,781	-29,500	0,005	-111,211	-38,121	-29,143
312	0,007	-112,755	-37,931	-29,477	0,030	-111,705	-36,174	-31,571	0,017	-115,676	-37,192	-30,607
336	0,025	-116,030	-36,420	-30,837	0,092	-110,863	-31,102	-36,094	0,059	-115,442	-33,669	-33,451

360	0,081	-114,219	-31,761	-34,635	0,240	-105,433	-17,276	-39,896	0,150	-111,121	-25,754	-38,658
384	0,197	-106,180	-21,785	-39,062	0,429	-96,516	5,149	-37,984	0,350	-101,251	-4,697	-39,334
408	0,340	-100,483	-6,460	-38,827	0,600	-85,545	32,231	-31,739	0,548	-89,655	23,571	-33,697
432	0,519	-87,990	14,987	-32,345	0,779	-69,120	69,701	-19,491	0,767	-71,594	70,142	-20,874
504		-49,930		0,168		-48,766		-0,010		-48,815		1,295
528		-49,101		0,864		-48,917		0,108		-48,880		1,184
	1,000	-38,421			1,000	-38,427			1,000	-38,519		
$\epsilon$ [‰]												
<i>Methanosarcina barkeri</i> bei 40°C												
Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-54,222	-38,395	-28,738	0,000	-56,254	-38,484	-28,565	0,000	-55,497	-38,387	-28,429
24	-0,003	-53,020	-38,444	-28,201	0,006	-52,946	-38,400	-28,234	-0,022	-53,165	-38,707	-28,145
96	-0,014	-53,182	-38,605	-27,991	-0,010	-52,568	-38,624	-27,913	-0,020	-52,230	-38,659	-27,855
192	0,001	-62,601	-38,362	-28,083	-0,008	-57,916	-38,629	-28,128	-0,006	-70,468	-38,567	-28,108
216	-0,002	-87,833	-38,515	-28,151	-0,002	-74,263	-38,559	-28,217	0,002	-97,794	-38,284	-28,581
240	0,013	-108,224	-37,447	-29,420	0,006	-101,110	-38,126	-28,782	0,019	-110,690	-36,980	-30,387
264	0,067	-110,028	-33,260	-33,577	0,028	-109,741	-36,400	-30,511	0,108	-108,915	-29,883	-36,411
288	0,384	-97,161	-1,726	-36,520	0,212	-102,326	-21,297	-37,496	0,469	-91,236	8,281	-33,511
312	0,783	-68,314	69,657	-12,028	0,562	-85,647	21,965	-27,988	0,829	-62,366	78,148	-8,814
336	0,923	-50,946	112,522	6,147	0,915	-53,899	126,836	2,851	0,934	-48,121	99,700	8,452
360		-50,465		6,634		-50,382		7,066		-48,195		7,974
	1,000	-38,395			1,000	-38,484			1,000	-38,387		
$\epsilon$ [‰]												

**Tabelle M.6:** Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. zinderi* bei unterschiedlichen Temperaturen.

<i>Methanobolus zinderi</i> bei 37°C												
Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-54,597	-38,688	-19,316	0,000	-51,546	-38,467	-18,948	0,000	-56,120	-38,723	-17,856
24	0,003	-88,350	-38,540	-18,281	-0,002	-77,073	-38,559	-18,147	0,006	-54,304	-38,635	-16,766
36	0,018	-110,320	-37,358	-18,549	0,013	-106,313	-37,583	-18,270	0,001	-65,864	-38,697	-16,795
48	0,102	-111,679	-30,396	-20,379	0,089	-111,789	-31,347	-20,132	0,022	-62,370	-38,192	-17,114
56	0,287	-105,362	-11,897	-23,213	0,267	-106,237	-13,829	-22,973	0,016	-98,402	-37,726	-17,221
64	0,609	-89,007	39,541	-24,393	0,587	-90,241	34,995	-24,278	0,029	-88,667	-37,217	-19,424
72		-56,251		-14,043		-61,245		-15,712	0,001	-59,749	-38,708	-16,373
80		-47,227		-10,873		-47,636		-10,881		-46,634		-14,237
	1,000	-38,688			1,000	-38,467						
$\epsilon$ [‰]												
<i>Methanobolus zinderi</i> bei 30°C												
Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-56,281	-38,555	-19,952	0,000	-55,892	-38,631	-19,846	0,000	-55,991	-38,527	-19,996
24	0,000	-66,235	-38,543	-19,001	0,006	-64,502	-38,475	-19,161	-0,003	-63,756	-38,605	-19,291
48	0,003	-80,932	-38,430	-19,222	0,001	-79,539	-38,602	-19,363	-0,003	-78,042	-38,640	-19,329
72	0,000	-99,183	-38,554	-19,327	0,006	-97,955	-38,291	-19,440	0,005	-97,210	-38,235	-19,354
96	0,010	-113,160	-37,818	-19,382	0,012	-113,120	-37,750	-19,524	0,015	-112,843	-37,361	-19,587
120	0,070	-115,027	-32,840	-20,847	0,069	-115,265	-32,929	-20,661	0,088	-114,274	-31,243	-21,161
144	0,640	-85,809	45,404	-23,943	0,631	-89,874	49,089	-24,624	0,763	-72,238	70,052	-20,967
168		-46,610		-12,518		-46,381		-12,468		-45,922		-12,288
192		-44,927		-12,448		-45,636		-12,480		-45,507		-12,250
	1,000	-38,555			1,000	-38,631			1,000	-38,527		
$\epsilon$ [‰]												
<i>Methanobolus zinderi</i> bei 40°C												
Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-51,534	-38,544	-19,058	0,000	-54,834	-38,662	-19,244	0,000	-50,921	-38,751	-19,377
24	0,002	-88,657	-38,429	-18,034	0,006	-91,876	-38,337	-18,305	0,007	-83,420	-38,458	-18,450
36	0,013	-109,482	-37,588	-18,333	0,012	-110,281	-37,789	-18,365	0,015	-107,453	-37,684	-18,623

48	0,078	-111,002	-32,419	-20,165	0,086	-111,405	-31,820	-20,128	0,112	-110,384	-29,684	-20,672
56	0,247	-104,889	-16,803	-23,136	0,268	-104,875	-14,374	-23,251	0,333	-102,133	-7,087	-23,864
64	0,641	-82,625	40,092	-23,431	0,618	-86,441	38,709	-24,159	0,600	-88,253	35,607	-24,485
72		-49,344		-11,840		-51,699		-13,006		-52,842		-13,546
80		-46,420		-10,824		-46,710		-11,132		-46,725		-11,245
	1,000	-38,544			1,000	-38,662			1,000	-38,751		
$\epsilon$ [‰]		-75,9 ± 0,8	-76,9 ± 0,0			-76,7 ± 2,0	-80,6 ± 0,6			-76,9 ± 2,4	-81,4 ± 0,9	

Tabelle M.7: Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. zinderi* bei 37°C unter H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

*Methanobolus zinderi* bei 37°C (H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-70,360	-38,516	-18,769	0,000	-47,960	-38,351	-18,663	0,000	-49,324	-38,370	-18,665
24	0,006	-86,455	-38,214	-17,703	0,002	-61,334	-38,315	-17,838	-0,001	-82,108	-38,424	-17,728
36	0,021	-109,592	-37,010	-17,756	0,016	-93,281	-37,447	-17,855	0,017	-107,708	-37,190	-17,883
48	0,133	-110,720	-27,473	-20,200	0,100	-108,606	-30,581	-19,850	0,113	-111,038	-29,099	-20,096
56	0,345	-103,451	-4,353	-23,325	0,286	-105,000	-11,618	-22,803	0,306	-104,559	-9,156	-23,821
64	0,677	-84,136	57,017	-22,470	0,604	-88,661	38,453	-23,614	0,608	-88,118	38,929	-23,490
72		-54,172		-12,219		-62,586		-16,229		-62,858		-15,998
80		-47,427		-10,423		-47,818		-10,663		-48,012		-10,429
	1,000	-38,516			1,000	-38,351			1,000	-38,370		
$\epsilon$ [‰]		-78,6 ± 3,2	-85,1 ± 1,0			-76,1 ± 4,5	-83,6 ± 0,7			-78,3 ± 2,6	-82,9 ± 0,6	

Tabelle M.8: Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *T. kivui* bei unterschiedlichen Temperaturen.

*Thermoanaerobacter kivui* bei 60°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-36,762	-39,642	0,000	-36,384	-38,997	0,000	-37,301	-38,805
24	0,065	-68,041	-37,652	0,075	-71,690	-36,362	0,083	-72,223	-35,797
48	0,345	-73,445	-21,855	0,388	-71,905	-18,150	0,414	-71,181	-15,893
72	0,589	-66,146	-1,644	0,633	-64,623	5,200	0,694	-60,752	10,858
96	0,807	-55,914	28,208	0,856	-52,363	40,318	0,906	-48,454	53,747
120	0,923	-47,798	57,956	0,958	-43,831	71,747	0,989	-40,109	83,320
168	1,009	-38,452	100,875	1,009	-37,843	89,074	0,991	-39,879	83,833
$\epsilon$ [‰]		-43,7 ± 0,9	-41,7 ± 0,6		-44,7 ± 1,5	-41,4 ± 1,0		-43,8 ± 0,3	-39,4 ± 0,9

*Thermoanaerobacter kivui* bei 45°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-37,042	-39,191	0,000	-37,458	-39,180	0,000	-37,405	-38,970
24	0,108	-41,445	-38,917	0,091	-41,691	-38,929	0,053	-46,133	-38,573
48	0,071	-49,832	-38,383	0,073	-48,007	-38,490	0,061	-70,264	-36,954
120	0,394	-71,824	-17,953	0,303	-73,909	-24,100	0,272	-74,626	-25,650
168	0,712	-63,723	21,425	0,704	-60,178	10,739	0,693	-62,117	13,296
216	0,934	-47,023	71,285	0,858	-53,289	46,117	0,900	-49,667	57,024
264	0,997	-39,574	109,663	0,998	-39,525	107,346	1,009	-37,725	99,716
$\epsilon$ [‰]		-44,1 ± 3,4	-42,3 ± 2,2		-41,8 ± 0,9	-44,2 ± 1,1		-41,9 ± 2,4	-42,4 ± 0,8

*Thermoanaerobacter kivui* bei 50°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-37,680	-39,180	0,000	-36,388	-39,057	0,000	-37,412	-38,930
24	0,025	-52,379	-38,845	0,023	-56,078	-38,665	0,046	-58,035	-38,004
48	0,158	-74,463	-32,564	0,177	-74,833	-31,358	0,242	-73,919	-27,746
72	0,361	-73,221	-19,927	0,365	-72,807	-19,653	0,476	-69,939	-10,731
96	0,557	-68,690	-2,011	0,547	-68,495	-3,569	0,659	-64,147	9,882
120	0,723	-60,625	16,755	0,704	-61,530	14,415	0,827	-54,450	35,359
168	0,964	-43,484	74,505	0,953	-44,932	79,223	0,997	-39,279	93,506
$\epsilon$ [‰]		-45,5 ± 2,2	-44,5 ± 0,8		-44,5 ± 1,8	-39,1 ± 1,1		-44,7 ± 1,3	-43,3 ± 1,0

*Thermoanaerobacter kivui* bei 55°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$
0	0,000	-37,634	-39,070	0,000	-37,710	-39,026	0,000	-36,196	-38,852
24	0,053	-68,418	-37,417	0,064	-69,913	-36,909	0,096	-72,128	-35,326
48	0,511	-68,286	-8,500	0,592	-65,852	-0,116	0,582	-66,323	-0,580
72	0,823	-54,462	32,599	0,931	-47,302	72,281	0,931	-46,546	64,790
96	1,000	-39,124	83,746	1,007	-38,393	50,648	0,999	-39,008	94,290
120	1,027	-38,145	-3,928	1,034	-37,180	17,880	0,906	-47,798	47,179
168	1,023	-37,062	49,178	1,038	-36,497	30,007	1,027	-36,474	53,187
$\epsilon [\text{‰}]$		-44,3	-41,6 $\pm$ 0,5		-44,2	-41,8 $\pm$ 0,5		-46,2	-38,8 $\pm$ 1,3

*Thermoanaerobacter kivui* bei 65°C

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{Acetat}} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$
0	0,000	-36,431	-39,059	0,000	-37,639	-38,945	0,000	-37,743	-38,705
24	0,048	-66,910	-37,643	0,182	-73,187	-31,305	0,199	-73,401	-30,086
48	0,447	-70,174	-13,883	0,583	-65,704	-1,505	0,600	-66,464	2,940
72	0,743	-59,283	19,540	0,841	-53,479	37,753	0,889	-49,675	48,846
96	0,950	-45,135	75,605	0,977	-41,874	87,138	0,984	-40,894	92,666
120	0,994	-39,845	95,699	0,997	-39,375	88,278	0,996	-39,228	87,819
168	1,005	-38,426	84,968	1,008	-37,993	88,466	1,004	-38,255	86,169
$\epsilon [\text{‰}]$		-43,5 $\pm$ 0,6	-38,7 $\pm$ 1,3		-43,8 $\pm$ 0,5	-42,0 $\pm$ 0,6		-46,5 $\pm$ 1,5	-40,1 $\pm$ 1,8

Tabelle M.9: Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. marburgensis* bei 65°C unter unterschiedlichen pH-Werten (carbonatfreies Medium).

*Methanothermobacter marburgensis* bei 65°C und pH 5,5 (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$
0	0,000		-36,747	0,000		-36,915
24			-37,088	-0,001	-73,618	-36,954
48	-0,002	-65,855	-36,807	0,121	-68,060	-32,608
72	0,222	-68,548	-27,698	0,507	-62,089	-11,058
96	0,581	-60,450	-3,879	0,746	-54,912	16,054
144	0,880	-46,497	34,924	0,918	-45,476	59,450
168	0,924	-44,929	62,681	0,950	-43,095	80,723
216	0,923	-44,220	53,266	0,962	-41,439	79,064
336	0,915	-41,763	17,053	0,961	-40,308	47,369
$\epsilon [\text{‰}]$		-31,1 $\pm$ 3,4	-36,8 $\pm$ 1,6		-34,7 $\pm$ 1,4	-39,1 $\pm$ 0,3

*Methanothermobacter marburgensis* bei 65°C und pH 6,0 (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$
0	0,000		-37,517	0,000		-37,427
24	0,217	-68,187	-29,031	0,127	-68,088	-32,962
48	0,507	-62,559	-11,724	0,467	-63,999	-14,172
72	0,720	-56,242	10,542	0,718	-56,153	10,216
96	0,854	-49,967	35,467	0,848	-50,126	33,374
144	0,940	-43,836	61,318	0,943	-43,531	62,985
216	0,956	-41,225	42,616	0,951	-41,513	41,707
336	0,929	-40,903	7,093	0,926	-41,209	9,598
$\epsilon [\text{‰}]$		-36,1 $\pm$ 1,6	-35,9 $\pm$ 1,0		-34,5 $\pm$ 2,3	-35,7 $\pm$ 0,9

*Methanothermobacter marburgensis* bei 65°C und pH 6,5 (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4} [\text{‰}]$	$\delta_{\text{CO}_2} [\text{‰}]$
0	0,000		-38,727	0,000		-38,831
24	0,232	-69,104	-29,545	0,069	-70,847	-36,466
48	0,614	-61,455	-2,579	0,080	-67,646	-36,309
72	0,790	-54,284	19,805	0,109	-62,414	-35,937
96	0,865	-49,188	28,088	0,377	-65,172	-22,903
144	0,904	-44,933	19,934	0,987	-40,086	54,784
216	0,889	-44,629	8,556	0,975	-39,604	-9,003
336	0,888	-44,498	6,951	0,953	-40,171	-11,826
$\epsilon [\text{‰}]$		-37,8 $\pm$ 3,4	-34,7 $\pm$ 1,9		-30,3 $\pm$ 4,7	-34,1 $\pm$ 1,3

*Methanothermobacter marburgensis* bei 65°C und pH 7,0 (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-40,499	0,000		-40,848
24	0,092	-72,359	-37,268	0,130	-72,761	-36,063
48	0,106	-71,806	-36,780	0,155	-72,470	-35,042
72	0,116	-71,808	-36,383	0,198	-70,705	-33,477
96	0,329	-70,838	-25,599	0,510	-66,774	-13,875
144	0,999	-40,571	34,915	0,974	-43,412	54,268
216	0,991	-40,750	-11,812	0,938	-43,204	-5,076
336	0,960	-41,528	-15,715	0,933	-43,285	-7,057
$\epsilon$ [‰]						
-33,9 ± 2,1 -37,8 ± 0,9 -34,9 ± 2,1 -38,3 ± 0,8						

*Methanothermobacter marburgensis* bei 65°C und pH 7,5 (carbonatfreies Medium)

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000		-41,720	0,000		-42,148
24	0,103	-72,713	-38,143	0,128	-73,672	-37,502
48	0,114	-72,620	-37,751	0,159	-72,615	-36,408
72	0,269	-70,812	-31,021	0,191	-71,568	-35,207
96	0,602	-63,909	-8,184	0,402	-69,186	-23,945
144	0,899	-50,178	33,919	0,873	-52,980	32,138
216	0,969	-43,834	23,782	0,985	-43,226	29,788
336	0,965	-43,467	6,329	0,992	-42,488	0,142
$\epsilon$ [‰]						
-35,2 ± 1,4 -33,1 ± 0,7 -34,4 ± 0,9 -36,2 ± 0,2						

**Tabelle M.10:** Gemessene Kohlenstoffisotopien und berechnete Fraktionierungskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von *M. barkeri* und *M. zinderi* bei 37°C unter verschiedenen Konzentrationen an Methylfluorid.

*Methanosarcina barkeri* bei 37°C

0% Methylfluorid					1% Methylfluorid				2% Methylfluorid			
Zeit [h]	<i>f</i> <sub>delta</sub>	δ <sub>CH<sub>4</sub></sub> [‰]	δ <sub>H<sub>3</sub>COH</sub> [‰]	δ <sub>CO<sub>2</sub></sub> [‰]	<i>f</i> <sub>delta</sub>	δ <sub>CH<sub>4</sub></sub> [‰]	δ <sub>H<sub>3</sub>COH</sub> [‰]	δ <sub>CO<sub>2</sub></sub> [‰]	<i>f</i> <sub>delta</sub>	δ <sub>CH<sub>4</sub></sub> [‰]	δ <sub>H<sub>3</sub>COH</sub> [‰]	δ <sub>CO<sub>2</sub></sub> [‰]
0	0,000	-81,061	-38,407	-28,102	0,000	-129,460	-38,077	-27,742	0,000	-73,129	-38,211	-28,915
24	0,003	-106,117	-38,171	-27,488	-0,001	-108,609	-38,153	-26,687	0,000	-90,858	-38,229	-28,084
36	0,019	-113,358	-36,965	-28,694	0,015	-113,320	-36,969	-27,767	0,005	-105,126	-37,877	-26,638
48	0,059	-113,815	-33,676	-32,231	0,061	-113,241	-33,216	-31,580	0,020	-111,098	-36,758	-27,851
56	0,270	-105,468	-13,654	-39,403	0,271	-104,713	-13,320	-39,741	0,098	-110,399	-30,339	-33,680
64	0,636	-84,403	42,133	-28,233	0,672	-78,103	43,928	-24,422	0,319	-102,945	-7,829	-39,700
72		-52,002		2,325		-50,640		-0,482	0,770	-73,252	79,307	-19,156
80		-51,607		3,717		-50,035		-0,383		-51,259		1,540
	1,000	-38,407			1,000	-38,077			1,000	-38,211		
ε [‰]		-76,9 ± 1,7	-79,6 ± 0,1			-77,3 ± 1,7	-73,6 ± 0,7			-75,0 ± 2,5	-79,9 ± 0,1	

3% Methylfluorid				
Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-125,797	-38,249	-28,163
24	0,004	-110,698	-37,986	-27,281
36	0,012	-111,414	-37,367	-28,381
48	0,040	-111,708	-35,220	-29,854
56	0,182	-106,768	-23,026	-37,534
64	0,566	-86,894	25,137	-33,223
72		-52,006		0,671
80		-51,390		0,957
	1,000	-38,249		
$\epsilon$ [‰]		-75,4 ± 0,6	-76,0 ± 0,0	

*Methanobolus zinderi* bei 37°C

0% Methylfluorid					1% Methylfluorid				2% Methylfluorid			
Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-51,457	-39,848	-18,949	0,000	-55,301	-40,008	-19,029	0,000	-56,007	-39,949	-19,184
8	0,010	-112,105	-39,112	-18,673	0,008	-110,733	-39,447	-18,945	0,005	-111,891	-39,589	-19,209
16	0,020	-114,611	-38,332	-19,404	0,024	-114,087	-38,155	-20,127	0,010	-114,273	-39,232	-19,538
24	0,050	-113,197	-36,015	-19,567	0,065	-113,262	-34,911	-20,311	0,016	-114,505	-38,700	-19,198

32	0,172	-109,195	-25,428	-22,507	0,181	-108,680	-24,882	-21,134	0,034	-114,629	-37,314	-20,076
40	0,330	-102,441	-9,076	-24,589	0,308	-104,103	-11,536	-24,437	0,055	-112,632	-35,692	-21,256
48	0,579	-90,218	29,449	-24,265	0,482	-96,406	12,568	-24,934	0,092	-111,931	-32,692	-21,281
56		-56,548		-14,333	0,677	-83,885	52,050	-23,038	0,114	-110,081	-30,916	-21,493
64		-48,677		-11,831		-53,979		-13,411	0,179	-108,182	-25,088	-23,961
72		-48,472		-11,242		-49,478		-11,892	0,270	-104,538	-16,092	-24,454
80		-49,304		-11,379		-49,314		-11,833	0,341	-101,930	-7,818	-25,025
88		-49,470		-12,063		-50,309		-12,468	0,467	-96,504	9,544	-25,743
96		-49,493		-11,782		-49,278		-11,065	0,663	-85,600	50,031	-24,748
108										-51,955		-15,662
120										-50,812		-15,218
144										-50,816		-15,295

1,000	-39,848	1,000	-40,008	1,000	-39,949
-------	---------	-------	---------	-------	---------

$\epsilon$ [‰]	-75,4 ± 1,6	-80,2 ± 0,9	-75,1 ± 1,9	-81,6 ± 0,7	-74,2 ± 1,7	-82,4 ± 1,0
----------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

## 3% Methylfluorid

Zeit [h]	$f_{\text{delta}}$	$\delta_{\text{CH}_4}$ [‰]	$\delta_{\text{H}_3\text{COH}}$ [‰]	$\delta_{\text{CO}_2}$ [‰]
0	0,000	-59,864	-39,721	-18,943
8	0,001	-110,468	-39,636	-18,983
16	-0,001	-113,949	-39,802	-19,940
24	-0,003	-114,398	-39,979	-19,100
32	0,000	-114,390	-39,733	-19,701
40	0,009	-113,036	-39,088	-20,594
48	0,011	-110,975	-38,942	-19,905
56	0,007	-112,884	-39,221	-19,562
64	0,015	-111,527	-38,650	-20,477
72	0,019	-110,807	-38,377	-19,458
80	0,034	-106,468	-37,347	-19,877
88	0,034	-106,449	-37,407	-19,977
96	0,038	-99,448	-37,331	-18,540
108	0,023	-109,651	-38,084	-19,568
120	0,045	-90,901	-37,327	-19,385
144	0,387	-100,053	-1,609	-24,797
168	0,913	-62,006	195,412	-18,836
192		-47,415		-12,752

1,000	-39,721
-------	---------

$\epsilon$ [‰]	-76,5 ± 6,0	-78,8 ± 0,9
----------------	-------------	-------------